

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

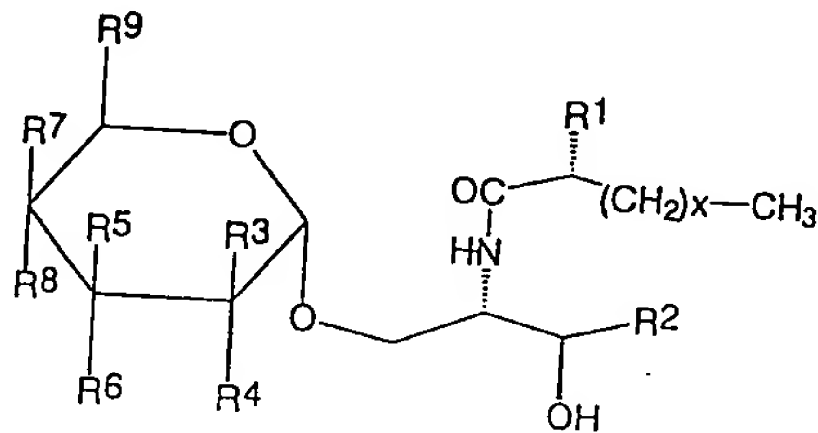
A6

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 31/70, C12N 5/06, 5/08 // C07H 15/04	A1	(11) 国際公開番号 WO98/44928 (43) 国際公開日 1998年10月15日(15.10.98)												
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01657 (22) 国際出願日 1998年4月10日(10.04.98) (30) 優先権データ 特願平9/92412 1997年4月10日(10.04.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 谷口 克(TANIGUCHI, Masaru)[JP/JP] 〒263-0043 千葉県千葉市稲毛区小仲台三丁目17番12号 Chiba, (JP) 河野 鉄(KAWANO, Tetsu)[JP/JP] 〒260-0843 千葉県千葉市中央区末広二丁目2番20号 末広サンフレアA202号 Chiba, (JP) 肥塚靖彦(KOEZUKA, Yasuhiko)[JP/JP] 〒370-1295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma, (JP)	(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100-0005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書													
(54) Title: NKT CELL ACTIVATORS CONTAINING α-GLYCOSYLCERAMIDES (54) 発明の名称 α-グリコシルセラミドを含有するNKT細胞活性化剤 (57) Abstract NKT cell activators, remedies for autoimmune diseases (for example, systemic erythematodes, systemic scleroderma, ulcerative colitis, encephalomyelitis, multiple sclerosis and human type I diabetes) and abortifacients. These drugs contain as the active ingredient α -glycosylceramides of general formula (I) or salts or solvates of the same. <div data-bbox="1244 1713 1900 2598"><p>(I)</p><p>a ... Cytotoxic rate (%)</p><p>b ... E/T ratio</p><p>c ... vehicle</p><table border="1"><caption>Figure 1: Cytotoxic rate and E/T ratio of KRN7000 and vehicle.</caption><thead><tr><th>E/T ratio</th><th>KRN7000 Cytotoxic rate (%)</th><th>Vehicle Cytotoxic rate (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>6</td><td>~45</td><td>~10</td></tr><tr><td>12.5</td><td>~60</td><td>~15</td></tr><tr><td>25</td><td>~75</td><td>~20</td></tr></tbody></table></div>			E/T ratio	KRN7000 Cytotoxic rate (%)	Vehicle Cytotoxic rate (%)	6	~45	~10	12.5	~60	~15	25	~75	~20
E/T ratio	KRN7000 Cytotoxic rate (%)	Vehicle Cytotoxic rate (%)												
6	~45	~10												
12.5	~60	~15												
25	~75	~20												

(57)要約

本発明は、NK T細胞活性化剤、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、潰瘍性大腸炎、脳脊髄炎、多発性硬化症、およびヒトI型糖尿病等）の治療剤、および墮胎剤の提供をその目的とする。本発明による薬剤は下記式（I）の α -グリコシルセラミドまたはその塩もしくは溶媒和物を有効成分として含むものである。



PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TC	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	CN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UC	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明 細 書

 α -グリコシルセラミドを含有するNK T細胞活性化剤発 明 の 背 景発明の分野

本発明は、 α -グリコシルセラミドを含有するNK T細胞活性化剤、自己免疫疾患治療剤および堕胎剤に関する。

関連技術

中等度にT細胞レセプター (TCR) を発現する intermediate TCR 細胞 (T C R^{i n t}細胞) は、Large Granulra Lymphocyte (LGL) 様の形態を示すこと、IL-2R β 鎖を常時表出すること、パーフォリン顆粒を有する点などでは、Natural Killer (NK) 細胞と類縁の細胞であるが、T C Rを有するという点でNK細胞とは決定的に異なる細胞群であることが明らかとなった (Watanabe, H. et al., J. Immunol., 155, 2972 (1995))。そして、マウスではInterleukin 12 (IL-12) により活性化されたT C R^{i n t}細胞の中でもNK 1. 1を発現している NK 1. 1⁺ T C R^{i n t} (NK T) 細胞が、腫瘍の肝臓や肺への血行性転移抑制の重要なエフェクター細胞であることが証明された (Hashimoto, W. et al., J. Immunol., 154, 4333 (1995); Anzai, R. et al., Immunol., 88, 82 (1996))。ことから、このNK T細胞は、癌細胞、寄生虫や原虫、およびリステリアや結核菌などの細胞内感染細菌の排除に重要な役割を果たす細胞であると考えられている (Seki, S. et al., Clin. Immunol., 28, 1069 (1996))。

さらに、このNK T細胞は、骨髄移植における急性期拒絶反応 (Yankelevich, B. et al., J. Immunol., 142, 3423 (1989))やヘルパーT細胞のTh1/Th2の分化制御によるI g E抗体産生の制御 (Yoshimoto, T. et al., J. Exp. Med., 179,

1285 (1994))などにも深く関与する細胞としても知られている。以上のように、このNK T細胞は、近年、新しい細胞群として非常に注目を集めている細胞群である。

$V\alpha 14^+$ NK T細胞は上記のNK T細胞の一つのサブセットであり、 $V\alpha 14^+$ NK T細胞の多くは $V\alpha 14 J\alpha 281$ mRNAを発現しており、これをTCR α 鎖として持っている。近年、この $V\alpha 14^+$ NK T細胞が、自己免疫疾患の発症に深く関わっていることが証明された。すなわち、MRL lpr/lpr マウスは、生後17 - 20 週齢で異常リンパ球の集積をきたす自己免疫疾患（ヒト全身性エリテマトーデス）のモデルマウスであるが、このマウスにおいては、自己免疫疾患発症に先行して、 $V\alpha 14^+$ NK T細胞が選択的に減少することが判明した（Mieza, M. A. et al., J. Immunol., 156, 4035(1996))。

同様の現象は、他の自己免疫疾患モデルマウスであるgld マウスや (NZBxNZW) F1マウスにおいても観察され、 $V\alpha 14^+$ NK T細胞が自己免疫疾患の発症に深く関わっていることが判明した（Makino, Y. et al., Clin. Immunol., 28, 1487 (1996))。

さらに、興味深いことに、ヒトにおいても同様の現象が観察された。すなわち、マウス $V\alpha 14 J\alpha 281$ 鎖と相同のヒトホモログである $V\alpha 24 J\alpha Q\alpha$ 鎖は、健常人では末梢血のCD4⁺/CD8⁺ T細胞中に20- 50% 存在しているが、強皮症患者ではまったく消失していた（Sumida, T. et al., J. Exp. Med., 182, 1163 (1995))。

このように、原因遺伝子や遺伝的背景の異なる様々な自己免疫疾患において、マウス $V\alpha 14^+$ NK T細胞やヒト $V\alpha 24 J\alpha Q\alpha$ T細胞が関与していることが知られている。このことから、上記のようにNK T細胞を活性化する作用を有するIL-12は、ヒト全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SEL) や全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) のような

自己免疫疾患の治療剤として期待された。しかし、IL-12をMRL lpr / lprマウスに投与すると、非投与マウスに比べ脾およびリンパ節に異常リンパ球 (CD3⁺ B220⁺ double negative T細胞) の著明な増加が認められた (筒井建紀ら, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 347 (1996))。

ところで、生体内には種々の糖がセラミドとβ結合しているβ-ガラクトシルセラミドやβ-グルコシルセラミドが存在している (Svennerholm, L. et al., Biochem. Biophys. Acta, 280, 626(1972) ; Karlsson, K.-A. et al., Biochim. Biophys. Acta, 316, 317(1973))。一方、α-ガラクトシルセラミドが顕著な免疫賦活作用および抗腫瘍作用を有すること (Morita, M. et al., J. Med. Chem., 38, 2176 (1995)) およびα-ガラクトシルセラミドやα-グルコシルセラミドのこれらの作用は、β-ガラクトシルセラミドやβ-グルコシルセラミドの作用よりもはるかに強力であること (Motoki, K. et al., Biol. Pharm. Bull., 18, 1487 (1995)) が知られている。さらに、α-グルコシルセラミド構造を有する化合物は、生体内に投与した場合に放射線防護作用 (Motoki, K. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 5, 2413 (1995))、マウスメラノーマ B16 の肺転移抑制作用 (Kobayashi, E. et al., Oncology Res., 7, 529 (1995))、およびマウス大腸癌 Colon26 やマウスTリンパ腫 EL-4 の肝転移抑制作用 (元木一宏ら日本癌学会総会記事、523 (1996)) を有することおよび血小板数や白血球数を増加させること (Motoki, K. et al., Biol. Pharm. Bull., 19, 952(1996)) が知られている。

しかし、α-グリコシルセラミド構造を有する化合物が自己免疫疾患に有効であることや堕胎作用を有することはもちろんのこと、α-グリコシルセラミド構造を有する化合物がNK T細胞に与える影響に関しても、報告されていない。

発明の概要

本発明者らは、今般、α-グリコシルセラミドがRAG-1 KO / Vα14 t g / Vβ8. 2 t gマウス (リンパ球画分にB細胞、T細胞およびNK細胞が

存在せず、NK T細胞が多く存在するマウス)におけるNK T細胞の腫瘍細胞に対する細胞障害活性を増強すること、 α -グリコシルセラミドによりNK T細胞(特にマウス $V\alpha 14^+$ NK T細胞およびヒト $V\alpha 24^+$ NK T細胞)の数が顕著に増加すること、 α -グリコシルセラミドがヒト全身性エリテマトーデスのモデルマウスであると考えられる MRL lpr/lprマウスの腋下および鼠径部のリンパ節の異常腫脹(異常リンパ球の集積)を抑制すること、そして α -グリコシルセラミドが4% DSS誘発マウス大腸炎の進行を抑制することを見出した。

本発明者らは、また、 α -グリコシルセラミドが実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制することを見いだした。マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎はヒト多発性硬化症のモデルである。本発明者らは、また、 α -グリコシルセラミドがNODマウスにおいて糖尿病の自然発症を抑制することを見いだした。NODマウスはヒトのI型糖尿病のモデルである。

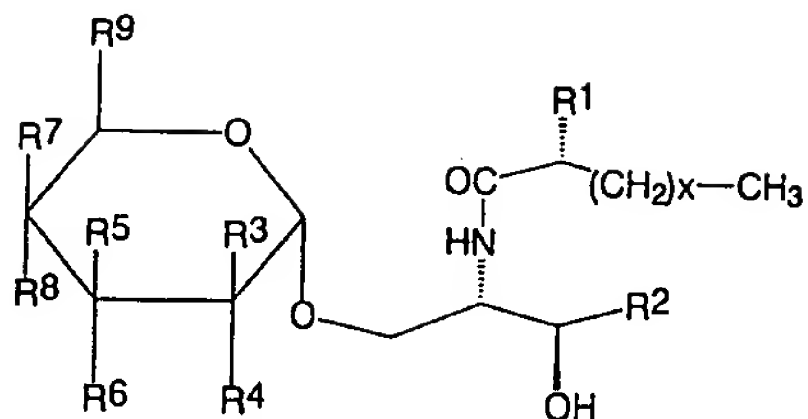
本発明者らは、更に、 α -グリコシルセラミドが妊娠マウスに対して墮胎効果を有することをも見いだした。

本発明は、NK T細胞活性化剤および活性化されたNK T細胞の提供をその目的とする。

本発明は、また、自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、潰瘍性大腸炎、脳脊髄炎、多発性硬化症、およびI型糖尿病等)の治療剤の提供をその目的とする。

本発明は、更に、墮胎剤の提供をその目的とする。

本発明によるNK T細胞活性化剤、自己免疫疾患治療剤および墮胎剤は、下記式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を有効成分として含んでなるもの、である：



(I)

(上記式中、

R^1 はHまたはOHであり、

Xは7～27のいずれかの整数であり、

R^2 は下記 (a) ～ (e) からなる群から選択される置換基であり (ここで、Yは5～17のいずれかの整数である)、

(a) $-\text{CH}_2 (\text{CH}_2)_Y \text{CH}_3$

(b) $-\text{CH} (\text{OH}) (\text{CH}_2)_Y \text{CH}_3$

(c) $-\text{CH} (\text{OH}) (\text{CH}_2)_Y \text{CH} (\text{CH}_3)_2$

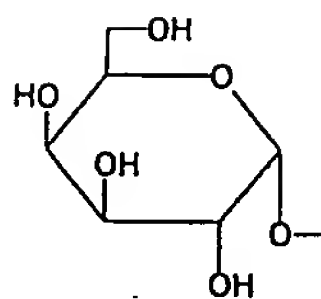
(d) $-\text{CH}=\text{CH} (\text{CH}_2)_Y \text{CH}_3$

(e) $-\text{CH} (\text{OH}) (\text{CH}_2)_Y \text{CH} (\text{CH}_3) \text{CH}_2 \text{CH}_3$ 、そして

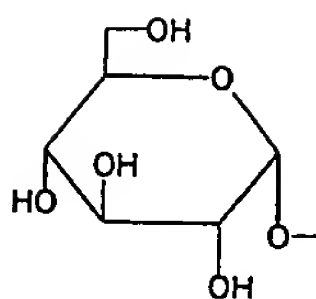
$R^3 \sim R^9$ は下記のi)～v)のいずれかで定義される置換基である：

i) R^3 、 R^6 、および R^8 がHのとき

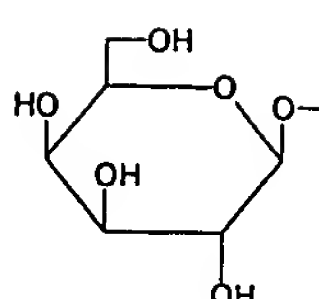
R^4 はH、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、または下記基 (A) ～ (D)：



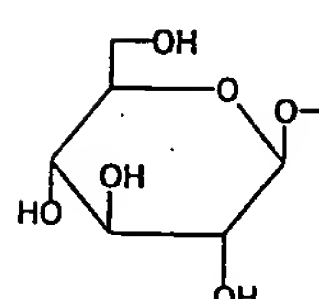
(A)



(B)



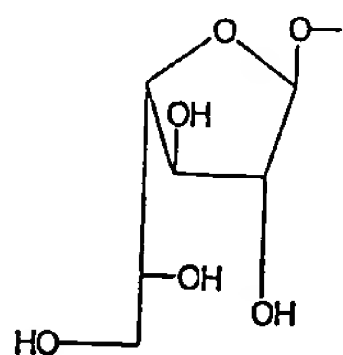
(C)



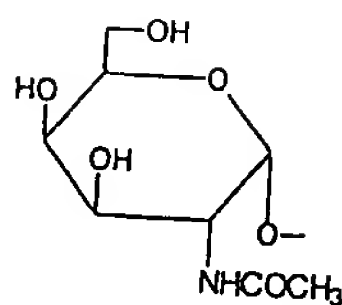
(D)

からなる群から選択される置換基であり、

R^5 はOH、または下記基 (E) および (F) :



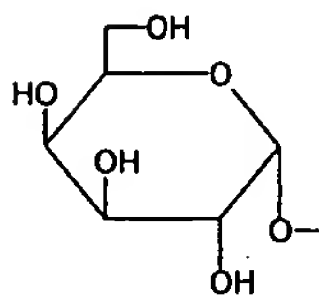
(E)



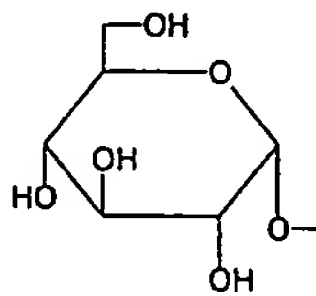
(F)

からなる群から選択される置換基であり、

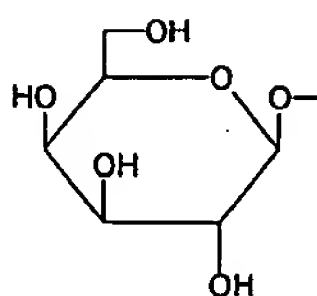
R^7 は、OHまたは下記基 (A) ~ (D) :



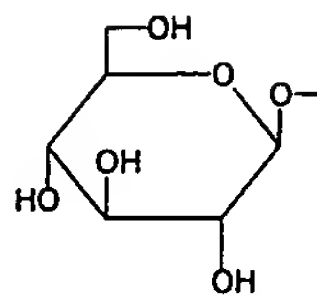
(A)



(B)



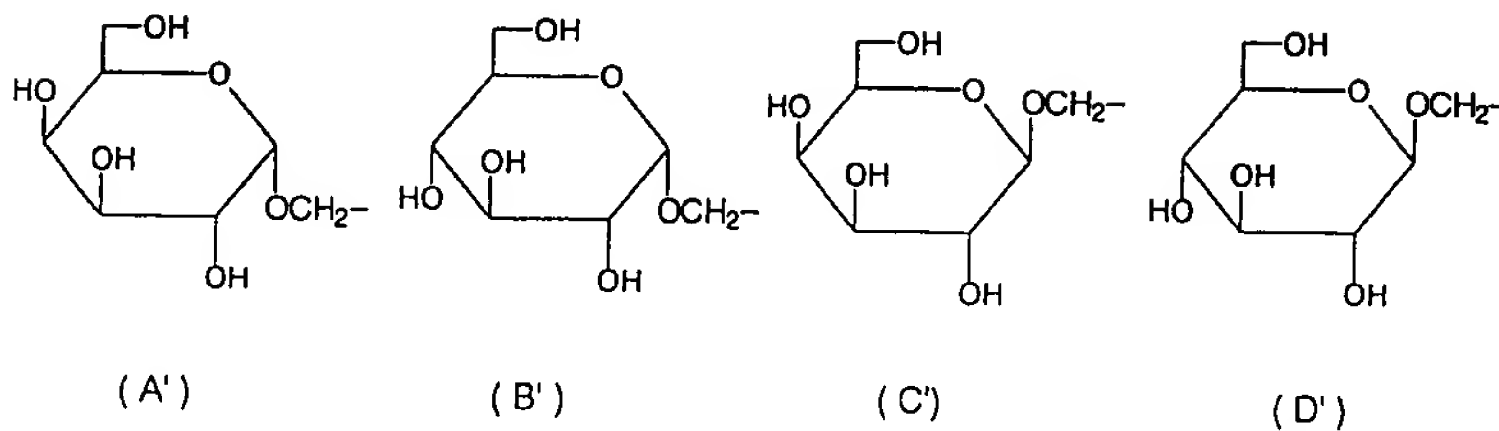
(C)



(D)

からなる群から選択される置換基であり、

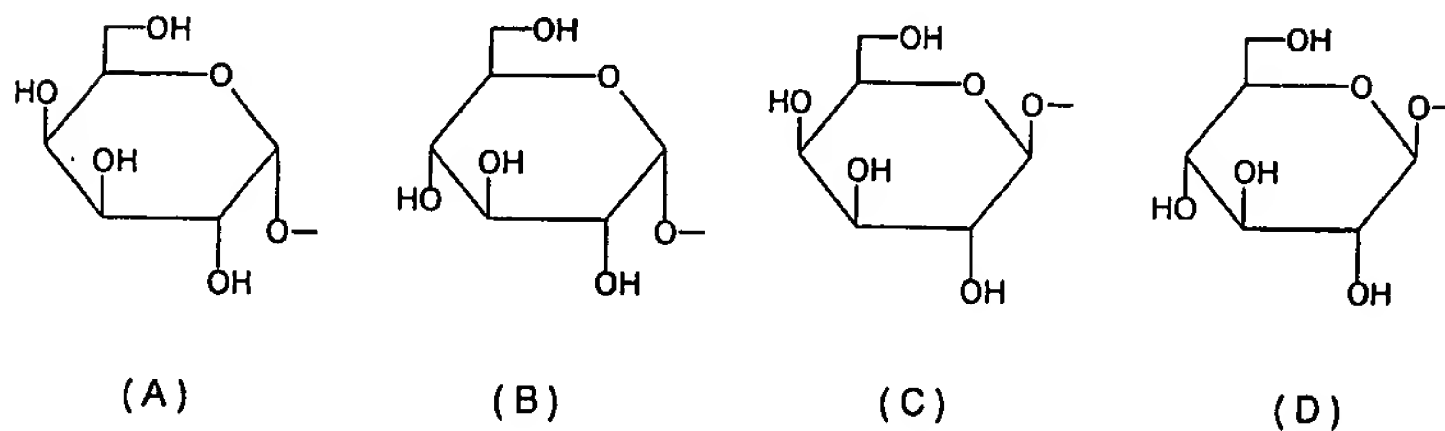
R^9 はH、 CH_3 、 CH_2OH 、または下記基 (A') ~ (D') :



からなる群から選択される置換基である ;

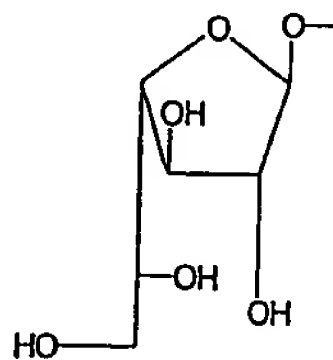
ii) R^3 、 R^6 および R^7 がHのとき

R^4 はH、OH、 NH_2 、 $NHCOCH_3$ 、または下記基 (A) ~ (D) :

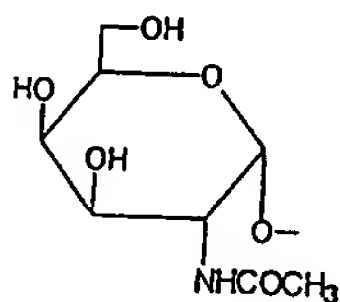


からなる群から選択される置換基であり、

R^5 はOH、または下記基 (E) および (F) :



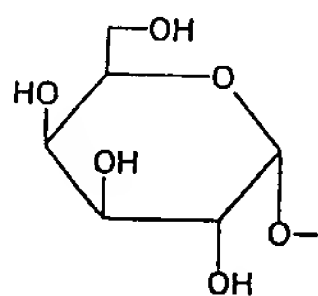
(E)



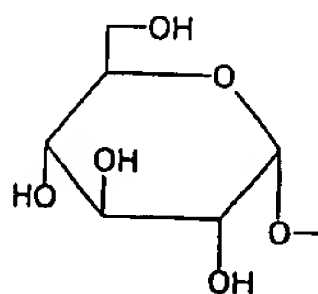
(F)

からなる群から選択される置換基であり、

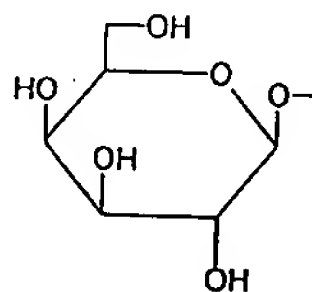
R^8 はOH、または下記基 (A) ~ (D) :



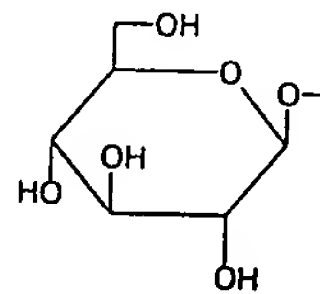
(A)



(B)



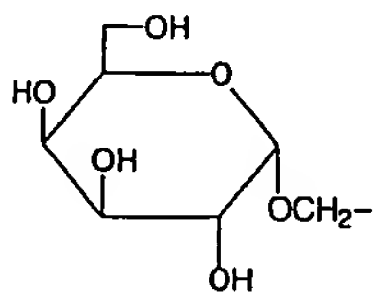
(C)



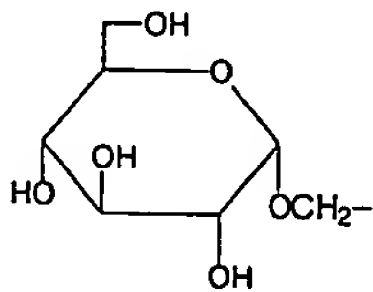
(D)

からなる群から選択される置換基であり、

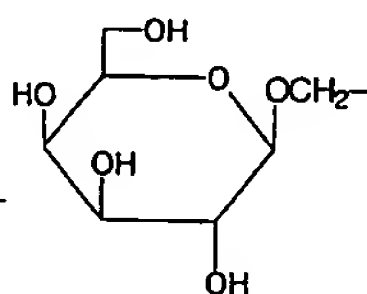
R^9 はH、 CH_3 、 CH_2OH または下記基 (A') ~ (D') :



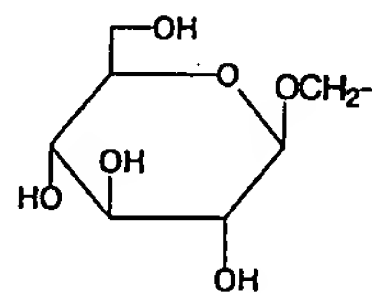
(A')



(B')



(C')



(D')

からなる群から選択される置換基である。)

図面の簡単な説明

図1はKRN7000のNK T細胞の腫瘍細胞障害活性増強作用を示した図である。E/T比は、エフェクター細胞数(脾臓細胞数)/ターゲット細胞数(YAC-1細胞数)の比を示す。

図2はKRN7000の脾臓におけるNK T細胞増加作用を示す。

A: 脾臓リンパ球画分のFACS解析の結果を示す。横軸はFITC標識抗TCR $\alpha\beta$ モノクローナル抗体の蛍光強度を、縦軸はCychrome標識抗NK1.1モノクローナル抗体の蛍光強度を示す。

B: 脾臓リンパ球画分のFACS解析の結果を示す。縦軸は、細胞数(Relative cell count)、横軸はPE標識V α 14モノクローナル抗体の蛍光強度を示す。白い部分は、無標識V α 14モノクローナル抗体で前処理した後、PE標識V α 14モノクローナル抗体で染色(コールドブロッキング)を行った際の蛍光強度を示す。影をつけた部分はビヒクルまたはKRN7000投与後のV α 14⁺細胞に対するPE標識V α 14モノクローナル抗体の蛍光強度の分布を示す。

C: 脾臓リンパ球画分の細胞数、および脾臓リンパ球画分中のT細胞数、NK細胞数、およびV α 14⁺NK T細胞数のKRN7000投与による変動を示した。●: V α 14⁺NK T細胞、○: 全細胞、◇: T細胞、□: NK細胞。

図3はKRN7000を投与した場合のMRL lpr/lprマウスのリンパ腫瘍の進展を経時的に観察した結果を示す。各リンパ節をその大きさにより、-(0)、+(1)、++(2)、+++ (3)の4段階にスコア化し、各マウスの左右の腋下(A)あるいは鼠径部リンパ節(B)のスコアの合計をリンパ腫瘍 index として示した。

図4はKRN7000を投与した場合の、MRL lpr/lprマウスの生存率を示す。

図5はKRN7000の4%DSS誘発マウス大腸炎抑制作用を示す。試験期間中、4%DSSは飲料水として継続して与えた。

A：マウス各群の体重の変動を示した。B：マウス各群の生存率を示した。

図6は、C57BL/6マウスにおいてミエリンオリゴ希突起膠細胞タンパク質(MOG)ペプチド等により誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)へのKRN7000の効果を示す。A：ビヒクル投与群、B：KRN7000(20 μ g/kg)投与群。EAEの症状を以下のようにスコア化した；臨床スコア、0：正常、1：尾の麻痺、2：正向反射の不全、3：後肢麻痺、4：前後肢麻痺、5：死亡。

図7は、NODマウスにおける自然発症糖尿病へのKRN7000の効果を示す。

図8は、KRN7000による $V\alpha 24^+$ NKT細胞増殖促進作用を示す。末梢血単核細胞を応答細胞として自己混合リンパ球反応を行った後、 $CD4^-CD8^-$ 細胞を回収し、標識化抗体により表現型を特定した。点線はコントロール抗体(マウスIgGまたはラットIgM)で染色した際の蛍光強度の分布を、実線は抗CD3、CD4、CD8、 $V\alpha 24$ 、 $V\beta 11$ 抗体(以上、Immunotech社)、抗NKR P1A抗体(Becton Dickinson社)で染色した際の蛍光強度の分布を示す。

図9は、KRN7000による $V\alpha 24^+$ NKT細胞増殖促進作用を示す。抗原提示細胞をKRN7000で処理した場合、抗原提示細胞の数に依存して $V\alpha 24^+$ NKT細胞の増殖が認められた。

図10は本発明で使用する α -グリコシルセラミド化合物の代表例(KRN7000)の合成反応経路の概略を示す。反応経路中、pyrはピリジン、BrPPh₃(CH₂)₁₂CH₃はトリデカントリフェニルホスホニウムブロミド、n-BuLiはn-ブチルリチウム、MsClは塩化メタンスルホニル、BnBr

は臭化ベンジル、1-PrOHはプロピルアルコールを表す。

図11は図10に続く合成反応経路の概略を示す。反応経路中、WSC-HC1は1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・塩酸塩、MS4Aはモレキュラーシーブス4A、Hex4NBrはテトラヘキシルアンモニウムブロミドである。

図12は実施例1～3の化合物の化学式を示す。

発明の具体的説明

式(I)の化合物

前記式(I)の化合物中、セラミド部分のXは、好ましくは11～25の整数である。

R^2 におけるYは好ましくは9～17の整数、より好ましくは11～15である。

式(I)のセラミド部分におけるXおよび R^2 の好ましい組み合わせは、Xが21～25の整数であり、 R^2 が置換基(b)(式中、Yは11～15である)を表す化合物、およびXが9～13の整数であり、 R^2 が置換基(a)(式中、Yは11～15である)を表す化合物である。

式(I)の糖部分における $R^3 \sim R^9$ の好ましい組み合わせは、 R^3 および R^6 がHを表し、 R^4 がOHまたは基(A)～(D)のいずれかの置換基を表し、 R^5 がOHまたは基(E)もしくは(F)の置換基を表し、 R^7 および R^8 がそれぞれHまたはOHのいずれかを表し(但し、 R^7 および R^8 の両方が同一の基を表すことはない)、 R^9 が CH_2OH 、 CH_3 、H、または基(A')～(D')のいずれかの置換基を表す化合物である。

更に好ましい組み合わせとしては、 R^3 および R^6 がHであり、 R^4 および R^5 がOHであり、 R^7 および R^8 がそれぞれHまたはOHのいずれかを表し(但し、 R^7 および R^8 の両方が同一の基を表すことはない)、かつ R^9 が CH_2O

Hまたは基(A') ~ (D') のいずれかの置換基を表す化合物、および R^3 、 R^6 および R^8 がHであり、 R^4 、 R^5 および R^7 がOHであり、かつ R^9 が CH_2OH である化合物が挙げられる。

式(I)の化合物の好ましい例としては、

Xが21~25の整数であり、

R^2 が置換基(b) (式中、Yは11~15の整数である) であり、

R^3 および R^6 がHであり、

R^4 がOHまたは基(A) ~ (D) からなる群から選択される基であり、

R^5 がOHまたは基(E) および(F) からなる群から選択される基であり、

R^7 および R^8 がそれぞれHまたはOHであり(但し、両方が同一の基を表すことはない)、

R^9 が CH_2OH または基(A') ~ (D') からなる群から選択される基である化合物、

Xが9~13の整数であり、

R^2 が置換基(a) (式中、Yは11~15の整数である) であり、

R^3 および R^6 がHであり、

R^4 および R^5 がOHであり、

R^7 および R^8 がそれぞれHまたはOHであり(但し、両方が同一の基を表すことはない)、

R^9 がH、 CH_3 、または CH_2OH である化合物、

Xが21~25の整数であり、

R^2 が置換基(b) (式中、Yは11~15の整数である) であり、

R^3 および R^6 がHであり、

R^4 および R^5 がOHであり、

R^7 および R^8 がそれぞれHまたはOHであり(但し、両方が同一の基を表す

ことはない)、

R^9 が CH_2OH または基(A')～(D')からなる群から選択される基である化合物、および

Xが21～25の整数であり、

R^2 が置換基(b)(式中、Yは11～15の整数である)であり、

R^3 、 R^6 、および R^8 がHであり、

R^4 、 R^5 、および R^7 がOHであり、

R^9 が CH_2OH である化合物

が挙げられる。

本発明による治療剤の有効成分として好ましい化合物群としては、

(2S, 3S, 4R) - 1 - (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - ヘキサコサノイルアミノ - 3, 4 - オクタデカンジオール (KRN7000)、

(2S, 3R) - 1 - (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-517)、

(2S, 3R) - 1 - (α -D-グルコピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-563)、

(2S, 3R) - 1 - (6'-デオキシ- α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-571)、

(2S, 3R) - 1 - (β -L-アラビノピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-577)、

O- α -D-ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 6) - O- α -D-ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 1) - (2S, 3S, 4R) - 2 - アミノ - N - ヘキサコサノイル - 1, 3, 4 - オクタデカントリオール (AGL-586)、

O- α -D-ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 6) - O- α -D-グルコピラノシル - (1 \rightarrow 1) - (2S, 3S, 4R) - 2 - アミノ - N - ヘキサコサノイル - 1,

3, 4-オクタデカントリオール (AGL-584)、
O- α -D-ガラクトピラノシル- (1 \rightarrow 2) - O- α -D-ガラクトピラノシル- (1 \rightarrow 1) - (2S, 3S, 4R) - 2-アミノ-N- [(R) - 2-ヒドロキシテトラコサノイル] - 1, 3, 4-オクタデカントリオール (S1140B-9)、
O- β -D-ガラクトフラノシル- (1 \rightarrow 3) - O- α -D-ガラクトピラノシル- (1 \rightarrow 1) - (2S, 3S, 4R) - 2-アミノ-N- [(R) - 2-ヒドロキシテトラコサノイル] - 1, 3, 4-オクタデカントリオール (719-7)、および
O- (N-アセチル-2-アミノ-2-デオキシ- α -D-ガラクトピラノシル- (1 \rightarrow 3) - O- [α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 2)] - O- α -D-ガラクトピラノシル- (1 \rightarrow 1) - (2S, 3S, 4R) - 2-アミノ-N- [(R) - 2-ヒドロキシテトラコサノイル] - 1, 3, 4-オクタデカントリオール (STL-8)
が挙げられる。

本発明による治療剤の有効成分として特に好ましい化合物は、

(2S, 3S, 4R) - 1- (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2-ヘキサコサノイルアミノ-3, 4-オクタデカンジオール (KRN7000) である。

式(I)の化合物は、薬学上許容される非毒性塩であることができる。式(I)の化合物の塩としては、酸付加塩、例えば、無機酸 (例えば塩酸、硫酸、硝酸、リン酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、オレイン酸、パルミチン酸、クエン酸、コハク酸、酒石酸、フマル酸、グルタミン酸、パントテン酸、ラウリルスルホン酸、メタンスルホン酸およびフタル酸) との塩が挙げられる。

式(I)の化合物は溶媒和物 (例えば、水和物) であることができる。

式(I)の化合物は、 α -グリコシルセラミドを合成するための合目的的な任意の方法により製造することができる。

まず、D-リキソースを出発物質としてセラミド部分を合成し、次いで、このセラミドに糖を導入することによって、式(I)の化合物を調製することができる。このような α -グリコシルセラミドの一般的な合成方法については、例えば、WO 93/5055号、WO 94/2168号、WO 94/9020号、およびWO 94/24142号を参照することができる。

また、式(I)の化合物は、天然物(生物等)からカラムクロマトグラフィー等によって単離、精製することもできる。

式(I)の化合物の用途

本発明による化合物の代表的化合物であるKRN 7000をRAG-1 KO/ $V\alpha 14$ tg/ $V\beta 8$. 2tgマウスに投与すると、NKT細胞の腫瘍細胞に対する細胞障害活性を増強することを見出した(薬理試験例1)。

次いで、本発明者らは、 α -グリコシルセラミドがNKT細胞、特に $V\alpha 14$ ⁺NKT細胞や $V\alpha 24$ ⁺NKT細胞、の数を顕著に増加させることを見出した(薬理試験例2、6、および9)。自己免疫疾患モデルマウスでは $V\alpha 14$ ⁺NKT細胞が減少し、強皮症患者では $V\alpha 24$ ⁺ $J\alpha Q\alpha$ T細胞が消失し、I型糖尿病の進展した患者では $V\alpha 24$ ⁺NKT細胞が極端に減少することが示唆されているように、原因遺伝子や遺伝的背景の異なる様々な自己免疫疾患において、マウス $V\alpha 14$ ⁺NKT細胞やヒト $V\alpha 24$ ⁺NKT細胞が関与していることが示されている(Mieza, M. A. et al., J. Immunol., 156, 4035 (1996); Makino, Y. et al., Clin. Immunol., 28, 1487 (1996); Sumida, T. et al., J. Exp. Med., 182, 1163 (1995); Wilson et al., Nature, 391, 177 (1998))。また、本発明者らは、ヒト全身性エリテマトーデスのモデルマウスであると考えられるMR L lpr/lprマウス(Sakamoto, A. Clin. Immunol., 28, 1558 (1996))

にKRN7000を投与したところ、腋下および鼠径部のリンパ節の異常腫脹（異常リンパ球の集積）が抑制された（薬理試験例3）。リンパ節の異常腫脹はMRL lpr/lprマウスにおいて加齢に伴って観察される特徴的な症状である。

従って、本発明の第一の面として、式（I）の化合物またはその塩もしくは溶媒和物はNK T細胞活性化剤として用いることができる。ここで「NK T細胞」は、ヒト $V\alpha 24^+$ NK T細胞およびマウス $V\alpha 14^+$ NK T細胞を含む。ヒト $V\alpha 24^+$ NK T細胞はヒト $V\alpha 24 J\alpha Q\alpha$ T細胞のサブセットであり、 $V\alpha 24^+$ ダブルネガティブ（ $CD4^- CD8^-$ ）T細胞（Dellabona, P. et al., J. Exp. Med., 180, 1171(1994)）と同義である。また、「NK T細胞活性化」は細胞障害活性の増強およびNK T細胞の増殖促進を含む。

本発明の第二の面として、式（I）の化合物またはその塩もしくは溶媒和物は自己免疫疾患治療剤として用いることができる。本発明において、「自己免疫疾患」とは、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、脳脊髄炎、I型糖尿病、慢性関節リュウマチ、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、交感性眼炎、Goodpasture 症候群（例えば、糸球体腎炎）、悪性貧血、および橋本病を含む。また、本明細書において、「治療」とは「予防」を含む。

式（I）の化合物およびIL-12は、妊娠マウスの流産を促進する（薬理試験例10）。従って、本発明の第三の面として、式（I）の化合物またはその塩もしくは溶媒和物およびIL-12は墮胎剤として用いることができる。式（I）の化合物およびIL-12は妊娠動物だけでなく、妊娠する可能性のある動物にも投与することができる。妊娠する可能性のある動物にあらかじめ式（I）の化合物またはIL-12を投与することにより妊娠を阻止することができる。従って、「墮胎剤」とは「避妊剤」を含む意味で用いられる。

式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物およびIL-12は、治療方法、投与方法、および投与目的によって決まる適当な剤型、具体的には、注射剤、懸濁剤、乳化剤、軟膏剤、クリーム剤錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、トローチ錠、直腸投与剤、油脂性坐剤、水溶性坐剤等の製剤、に処方することができる。

これらの各種製剤は、下記の薬学上許容される担体等を用いて常法により製造することができる：賦形剤、例えば、溶剤（例えば、水、生理食塩水）、増量剤および充てん剤（例えば、乳糖、デンプン、結晶セルロース、マンニトール、マルトース、リン酸水素カルシウム、軟質無水ケイ酸、炭酸カルシウム）；補助剤、例えば、可溶化剤（例えば、エタノール、ポリソルベート剤）、結合剤（例えば、デンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アラビアゴム）、崩壊剤（例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油）、安定剤（例えば、乳糖、マンニトール、マルトース、ポリソルベート類、マクロゴール類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油）、等張化剤、湿潤化剤、潤滑剤、分散剤、緩衝剤、溶解補助剤；添加剤、例えば、抗酸化剤、保存剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、着色剤、および甘味剤。

また、各種製剤には、必要に応じて、グリセリン、ジメチルアセトアミド、70%乳酸ナトリウム、界面活性剤、塩基性物質（例えば、エチレンジアミン、エタノールアミン、炭酸ナトリウム、アルギニン、メグルミン、トリスアミノメタン）を添加することもできる。

本発明において、式(I)の化合物およびIL-12は、合目的な任意の投与経路、具体的は、動物の場合には、腹腔内投与、皮下投与、静脈または動脈への血管内投与、注射による局所投与などの方法が可能である。また、ヒトの場合に

は、静脈内投与、動脈内投与、注射による局所投与、腹腔または胸腔への投与、皮下投与、筋肉内投与、舌下投与、経皮吸収または直腸内投与により投与することができる。静脈内投与がもっとも好ましい。

本発明による治療剤における各有効成分は、個々の状況に応じて連続的または間欠的に投与できる。具体的な投与量は、投与方法、患者の諸条件、たとえば、年齢、体重、性別、感受性、投与時間、併用薬剤などにより変化する。一般に、式(I)の化合物およびIL-12の投与量は、例えば、静脈内投与では、ヒト成人に対して1日あたり0.001~10mg程度、好ましくは、0.01~1mg、である。式(I)の化合物は、凍結乾燥製剤にするのが好ましく、投与直前に注射用蒸留水等で溶解し、患者に投与するのが好ましい。

本発明によれば、式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を、ヒトを含む哺乳動物に投与することを含む自己免疫疾患の治療法が提供される。

本発明によれば、また、式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物により活性化されたNK T細胞（活性化NK T細胞）をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、自己免疫疾患の治療法が提供される。

活性化NK T細胞は、NK T細胞を式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物の存在下インビトロで培養することにより得ることができる。また、式(I)の化合物を投与した哺乳動物の体内から活性化NK T細胞を単離することによって得てもよい。

式(I)の化合物とともにインビトロで培養するNK T細胞は、健常人から単離されたものであってもよく、また患者または患者であると疑われる者から単離されたものであってもよい。ヒトを治療する場合、NK T細胞はヒトV α 24⁺ NK T細胞であることが好ましい。

活性化NK T細胞の哺乳動物への投与は、活性化NK T細胞を哺乳動物の体内、例えば、静脈内に移植することにより行うことができる。

本発明によれば、NK T細胞を式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物の存在下インビトロで培養することを含む、NK T細胞の活性化法が提供される。

本発明によれば、式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物あるいは IL-12 を、ヒトを含む哺乳動物に投与することを含む堕胎法が提供される。

実 施 例

以下の実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

化合物の合成および単離・精製

実施例1 (2S, 3S, 4R) - 1 - (α-D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - ヘキサコサノイルアミノ - 3, 4 - オクタデカンジオール (KRN7000) の合成

合成工程は、図10および11に示される通りである。

(1) 化合物G1の合成

D-リキソース (200 g、1.33 mol) に塩化カルシウムで乾燥したアセトン溶液 (3.0 L) に硫酸 (0.5 mL) を加え、18時間室温で攪拌した。モレキュラーシーブス4Aの粉末 (100 g) を加え、反応液を中和後、セライト濾過し、残渣をアセトンで洗浄した。濾液と洗液をあわせて減圧濃縮し、G1の粗生成物を得た。収量240 g (95%)。これ以上の精製を行わずに次の工程に用いた。分析用のサンプルは、ヘキサン：アセトン (9：1) を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

mp 76-78°C; FDMS m/z 191 ($M+1$)⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.45 (1H, d, J=1.8 Hz), 4.83 (1H, dd, J=3.7, 5.5 Hz), 4.64 (1H, d, J=6.1 Hz), 4.27-4.30 (1H, m), 3.90-3.99 (2H, m),

1. 48 (3H, s), 1.32 (3H, s)。

(2) 化合物G2の合成

化合物G1 (239 g、約1.26 mmol) の塩化メチレン溶液 (168 ml) に、ピリジン (10 ml)、塩化トリチル (39.0 g) を加え、32℃で4時間攪拌した。エタノール (8 ml) を滴下し、室温で2時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣は酢酸エチルに溶解し、0℃に冷却して結晶化した。収量501 g (D-リキソースより87%)。

mp 174–176℃; FDMS m/z 432 M^+ ; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.21–7.49 (15H, m), 5.38 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 4.75 (1H, dd, $J=3.7, 6.1$ Hz), 4.59 (1H, d, $J=6.1$ Hz), 4.31–4.35 (1H, m), 3.43 (1H, dd, $J=4.9, 9.8$ Hz), 3.39 (1H, dd, $J=6.7, 9.8$ Hz), 1.29 (3H, s), 1.28 (3H, s)。

(3) 化合物G3の合成

トリデカントリフェニルホスホニウムブロミド (962 g、1.16 mol; 1-ブロモトリデカン、トリフェニルホスフィンを4.5時間、140℃に加熱して調製した) のTHF溶液 (1500 ml) に、アルゴン雰囲気下、n-ブチルリチウムの2.5 Mヘキサン溶液 (462 mL; 366 mmol) を0℃で滴下した。滴下終了後、15分間攪拌し、化合物G2 (250 g、579 mmol) のTHF溶液 (450 ml) を滴下した。室温まで、徐々に温度を上げつつ18時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣にヘキサン:メタノール:水 (10:7:3、1000 ml) の混液を加え、飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄した。水層はヘキサン (500 ml) で抽出し、すべての有機層をあわせて無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、G3の粗生成物を得た。これ以上の精製を行

わずに次の工程に用いた。収量339g(98%)。分析用のサンプルは、ヘキサン：酢酸エチル(9：1)を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

FDMS m/z 598 M^+ ; 1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$)
 δ 7.21–7.45 (15H, m), 5.48–5.59 (2H, m), 4.91 (0.7H, t, $J=7.3$ Hz), 4.44 (0.3H, t, $J=7.3$ Hz), 4.26 (0.3H, dd, $J=4.3, 7.3$ Hz), 4.21 (0.7H, dd, $J=4.3, 6.7$ Hz), 3.75 (0.7H, m), 3.69 (0.3H, m), 3.24 (0.3H, dd, $J=4.9, 9.8$ Hz), 3.17 (0.7H, dd, $J=4.9, 9.8$ Hz), 3.09–3.14 [1H, (3.11, dd, $J=4.9, 9.2$ Hz), H1b Eoverlapped], 1.75–2.03 (2H, m), 1.49 (3H, s), 1.39 and 1.38 (3H, each s), 1.21–1.34 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.7$ Hz)。

(4) 化合物G4の合成

化合物G3 (338g、約565mmol)の塩化メチレン溶液(1500ml)にピリジン(500ml)を加え、塩化メタンスルホニル(49ml、633mmol)を滴下し、31℃で24時間攪拌した。エタノール(40ml)を滴下し、室温で1時間攪拌した。減圧濃縮後、残渣にヘキサン：メタノール：水(10：7：3、1000ml)の混液を加え、分液した。水層はヘキサン(200ml)で3回抽出し、すべての有機層をあわせて無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、G4の粗生成物を得た。これ以上の精製を行わずに次の工程に用いた。収量363g(95%)。分析用のサンプルは、ヘキサン：酢酸エチル(9：1)を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

FDMS m/z 676 M^+ ; 1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$)

δ 7.21–7.47 (15H, m), 5.41 (0.7H, ddd, $J=5.5, 9.2, 11.0$ Hz), 5.32 (0.7H, bt, $J=11.0$ Hz), 5.22 (0.3H, bdd, $J=9.2, 15.0$ Hz), 5.02 (0.3H, dt, $J_t=7.3$ Hz, $J_d=15.0$ Hz), 4.8 (0.7H, ddd, $J=3.1, 5.5, 7.9$ Hz), 4.73 (0.7H, dd, $J=5.5, 9.8$ Hz), 4.64–4.67 (0.3H, m), 4.61 (0.3H, dd, $J=5.5, 9.2$ Hz), 4.48 (0.7H, dd, $J=5.5, 7.9$ Hz), 4.22 (0.3H, dd, $J=5.5, 9.2$ Hz), 3.55 (0.3H, dd, $J=2.4, 11.6$ Hz), 3.45 (0.7H, dd, $J=3.2, 11.0$ Hz), 3.06–3.12 [4H, (3.12, s), (3.11, s), (3.09, dd, $J=3.1, 11.0$ Hz)], 1.66–1.82 (2H, m), 1.47 and 1.46 (3H, each s), 1.39 (3H, s), 1.13–1.35 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.8$ Hz)。

(5) 化合物G5の合成

化合物G4 (362 g、約536 mmol) の塩化メチレン溶液 (1500 ml) にメタノール (350 ml) を加え、これに濃塩酸 (200 ml) を滴下し、5 h 室温で攪拌した。反応液に炭酸水素ナトリウムを加えて中和後、濾過した。濾液を減圧濃縮し、残渣に酢酸エチルを加え、食塩水で洗浄した。水層は酢酸エチルで抽出し、すべての有機層をあわせて無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。ヘキサンより結晶化した。収量161 g (G2より70%)。

mp 66–67°C; FDMS m/z 377 ($M-H_2O$)⁺; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3+D_2O$) δ 5.86 (0.3H, dt, $J_t=7.3$ Hz, $J_d=14.7$ Hz), 5.77 (0.7H, dt, $J_t=7.3$, $J_d=10.4$ Hz), 5.55 (0.3H, br. dd, $J=7.3, 14.$

7 Hz), 5.49 (0.7H, bt, $J=9.8$ Hz), 4.91–4.97 (1H, m), 4.51 (0.7H, bt, $J=9.8$ Hz), 4.11 (0.3H, bt, $J=7.3$ Hz), 3.94–4.03 (2H, m), 3.67–3.73 [1H, (3.70, dd, $J=3.1, 6.7$ Hz), (3.69, dd, $J=3.1, 7.3$ Hz)], 3.20 and 3.19 (3H, each s), 2.05–2.22 (2H, m), 1.22–1.43 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.7$ Hz)。

(6) 化合物G6の合成

化合物G5 (160 g、405 mmol) のTHF溶液 (780 ml) に5% パラジウム–硫酸バリウム (16 g) を加え、反応容器を水素ガスで置換後、室温にて20時間攪拌した。反応液をセライト濾過後、クロロホルム：メタノールの混液 (1 : 1) で洗浄した。濾液と洗液をあわせ、減圧濃縮した。残渣は酢酸エチルより結晶化した。収量146 g (91%)。

$[\alpha]_D^{23} +12^\circ$ (c1, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1:1$) ; mp 124–126°C ; FDMS m/z 397 ($M+1$)⁺ ; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$) δ 4.93–4.96 (1H, m, H2), 3.91 (1H, dd, $J=6.7, 12.2$ Hz), 3.85 (1H, dd, $J=4.9, 12.2$ Hz), 3.54–3.60 (1H, m), 3.50 (1H, dd, $J=1.8, 8.5$ Hz), 3.19 (3H, s), 1.75–1.83 (1H, m), 1.53–1.62 (1H, m), 1.21–1.45 (24H, m), 0.89 (3H, t, $J=6.7$ Hz)。

(7) 化合物G7の合成

化合物G6 (145 g、365 mmol) のDMF溶液 (1000 ml) にアジ化ナトリウム (47 g、730 mmol) を加え、95°Cで4時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣に酢酸エチル (450 ml) を加え、水洗した。水層は酢

酸エチルで再抽出した。すべての有機層をあわせて食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、減圧濃縮し、G7の粗生成物を得た。収量122g (97%)。これ以上の精製を行わずに次の工程に用いた。収量126g (95%)。分析用のサンプルは、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1) を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

$[\alpha]_D^{23} +16.5^\circ$ (c 0.5, CHCl_3 -MeOH, 1 : 1) ; mp $92-93^\circ\text{C}$; FDMS m/z 344 ($M+1$)⁺ ; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 3.91 (1H, dd, $J=3.7, 11.6\text{ Hz}$) , 3.75 (1H, dd, $J=7.9, 11.6\text{ Hz}$) , 3.49-3.61 (3H, m) , 1.50-1.71 (2H, m) , 1.22-1.46 (24H, m) , 0.90 (3H, t, $J=6.7\text{ Hz}$) 。

(8) 化合物G8の合成

化合物G7 (121g、約352mmol) の塩化メチレン溶液 (750ml) にピリジン (250ml) 、塩化トリチル (124g、445mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。エタノール (30ml) を滴下し、室温で30分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化アンモニウム水溶液、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣は、ヘキサン：酢酸エチル (10 : 1) を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。収量34.4g (G6より52%) 。

$[\alpha]_D^{24} +11.9^\circ$ (c 0.9, CHCl_3) , FDMS m/z 585 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$) δ 7.24-7.61 (15H, m) , 3.62-3.66 (2H, m) , 3.51-3.57 (2H, m) , 3.42 (1H, dd, $J=6.0, 10.4\text{ Hz}$) , 1.23-1.56 (26H, m) , 0.88 (3H, t, $J=6.7\text{ Hz}$) 。

(9) 化合物G9の合成

化合物G8 (33.5 g、57.3 mmol) のDMF溶液 (300 ml) に60%水素化ナトリウム (5.5 g、NaHとして約138 mmol) を加え、室温で40分間攪拌した。反応液を0℃に冷却し、臭化ベンジル (15 ml、120 mmol) を滴下した。室温まで徐々に温度をあげながら18時間攪拌した。反応液に氷水 (100 ml) を加えて、反応を停止した後、酢酸エチルを用いて抽出した。抽出液は食塩水で3回洗浄し、すべての有機層をあわせて無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、G9の粗生成物を得た。これ以上の精製を行わずに次の工程に用いた。収量42.2 g (96%)。分析用のサンプルは、ヘキサン：酢酸エチル (100 : 1) を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

$[\alpha]_D^{24} + 9.8^\circ$ (c 1.0, CHCl_3), FDMS m/z 738 ($\text{M}-\text{N}_2$)⁺; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.07–7.48 (25H, m), 4.57 (1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.44 (1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.41 (2H, s), 3.73–3.79 (1H, m), 3.46–3.56 (2H, m), 3.37 (1H, dd, $J=8.6, 10.4$ Hz), 1.20–1.64 (26H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.7$ Hz)。

(10) 化合物G10およびG11の合成

化合物G9 (41.2 g、約54 mmol) の1-プロパノール溶液 (250 ml) にメタノール (30 ml) を加え、更に5%パラジウム炭素 (4.1 g)、蟻酸アンモニウム (27.1 g、4.3 mmol) を加えた。室温で16時間攪拌後、酢酸エチルで希釈し、セライト濾過した。濾液を減圧濃縮し、酢酸エチルで溶解後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で3回洗浄し、すべての有機層をあわせて無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、G10の粗生成物を得

た。収量38.9g(98%)。得られたG10は、これ以上の精製を行わずに次の工程に用いた。

化合物G10の塩化メチレン溶液(300ml)に、ヘキサコサン酸(22.4g、56.5mmol)、WSC塩酸塩(12.6g、64.6mmol)を加え、2時間加熱還流した。室温まで冷却後、減圧濃縮した。残渣に酢酸エチル(500ml)を加え、0.5M塩酸水溶液、食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、更に食塩水で洗浄した。すべての有機層をあわせて無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、G11の粗生成物を得た。収量53.2g(88%)。得られたG11は、これ以上の精製を行わずに次の工程に用いた。分析用のサンプルは、ヘキサン：酢酸エチル(100：1)を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

$[\alpha]_D^{24} + 5.3^\circ$ (c 0.4, CHCl_3) ; FDMS m/z 1118 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.20–7.38 (2H, m), 5.57 (1H, d, $J=9.1\text{Hz}$), 4.80 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.48–4.50 (3H, m), 4.24–4.32 (1H, m), 3.83 (1H, dd, $J=3.0, 6.7\text{Hz}$), 3.43–3.51 (2H, m, H1a), 3.29 (1H, dd, $J=4.3, 9.8\text{Hz}$), 1.92 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.28–1.60 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J=6.7\text{Hz}$)。

(11) 化合物G12の合成

化合物G11(52.2g、約47mmol)の塩化メチレン溶液(180ml)にメタノール(36ml)を加え、次いで10%塩酸メタノール溶液(30ml)を滴下し、室温で2時間攪拌した。反応液は粉状の炭酸水素ナトリウム(18g)で中和し、セライト濾過した。残渣は塩化メチレンで洗浄した。濾液と洗液をあわせ、食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減

圧濃縮した。残渣をアセトンに加熱溶解し、0℃に冷却して沈殿化により精製した。収量38.6g (G9より77%)。

$[\alpha]_D^{24} -29.7^\circ$ (c 0.7, CHCl_3) ; mp 75–76.5℃ ;
FDMS m/z 876 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ
7.30–7.47 (10H, m), 6.03 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$),
4.72 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.66 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$),
4.61 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.45 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$),
4.12–4.17 (1H, m), 4.00 (1H, dt, $J_t=4.3$, $J_d=7.3\text{Hz}$), 3.67–3.72 (2H, m), 3.61
(1H, ddd, $J=4.3$, 8.6, 11.6Hz), 1.94–2.05
(2H, m), 1.15–1.69 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J=6.1\text{Hz}$)。

(12) 化合物G13の合成

1) 2, 3, 4, 6-テトラ-O-ベンジル-D-ガラクトピラノシルアセテート (79.8g) をトルエン (160ml) およびイソプロピルエーテル (520ml) の混液に溶解し、-10~0℃に冷却した。これに、2.0等量のHBrを含むイソプロピルエーテル溶液を加えた (2.8mmol/ml、約100ml)。-10~0℃で約90分間攪拌後、反応液に5%炭酸水素ナトリウム水溶液を注ぎ、攪拌して過剰のHBrを中和した。全量を分液ロートに移して分液後、水層を廃棄し、10%塩化ナトリウム水溶液で2回洗浄した。減圧濃縮して2, 3, 4, 6-テトラ-O-ベンジル- α -D-ガラクトピラノシルブロミド (GalBr) のシロップを得た。

2) 化合物G12 (60.0g、68.6mmol)、テトラヘキシルアンモニウムブロミド (89.4g、206mmol)、モレキュラーシーブス4A (60g) のトルエン溶液 (420ml) に、DMF (140ml) 次いで、G

a 1 B r (約 1 3 7 m m o l) のトルエン溶液 (2 5 0 m l) を加え、室温で 7 2 時間攪拌した。反応液にメタノール (1 2 m l) を加え、2 時間攪拌した。セライト濾過後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣にアセトニトリルを加え、2 時間攪拌し、沈殿を得た。得られた沈殿を減圧乾燥し、乾燥粉体を得た。これをヘキサン：酢酸エチル (8 : 1) を溶出溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。収量 7 0 . 9 g (7 4 %)。

$[\alpha]_D^{24} + 18.8^\circ$ (c 0.9, CHCl_3) ; mp 74–75°C ; FD MS m/z 1399 ($\text{M}+1$)⁺ ; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.21–7.37 (30H, m), 6.12 (1H, d, $J=9.0$ Hz), 4.91 (1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.84 (1H, d, $J=3.7$ Hz), 4.72–4.80 (4H, m), 4.35–4.65 (7H, m), 4.12–4.18 (1H, m), 3.99–4.05 (2H, m), 3.84–3.93 (4H, m), 3.73 (1H, dd, $J=3.7, 11.0$ Hz), 3.47–3.51 (2H, m), 3.42 (1H, dd, $J=6.1, 9.1$ Hz), 1.87–1.99 (2H, m), 1.18–1.70 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J=7.4$ Hz)。

(13) 化合物 KRN7000 の合成

化合物 G13 (60.0 g、42.9 mmol) をエタノール (960 ml) に加えて懸濁させ、これに 20% 水酸化パラジウム (6.0 g) のエタノール懸濁液を加えた。更に水素源となる 4-メチルシクロヘキセン (120 ml、93.5 mmol) を加え、4 時間加熱還流した後、濾過し、触媒を除いた。残渣は加温したエタノールで洗浄した。濾液を室温放置することによって得た白色沈殿を濾過、減圧乾燥した。得られた粉体をエタノール：水 (92 : 8、3.5 L) に懸濁し、攪拌しながら加熱溶解後、室温放置することによって再度沈殿化した。

沈殿液を濾過し、濾取したケーキを減圧乾燥し、白色粉末を得た。収量35.0 g (95%)。

$[\alpha]_D^{23} + 43.6^\circ$ (c 1.0, pyridine); mp 189.5–190.5°C; negative FABMS m/z 857 (M-H)⁻; IR (cm⁻¹, KBr) 3300, 2930, 2850, 1640, 1540, 1470, 1070; ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ 8.47 (1H, d, J=8.5 Hz), 5.58 (1H, d, J=3.7 Hz), 5.27 (1H, m), 4.63–4.70 (2H, m), 4.56 (1H, m), 4.52 (1H, t, J=6.1 Hz), 4.37–4.47 (4H, m), 4.33 (2H, m), 2.45 (2H, t, J=7.3 Hz), 2.25–2.34 (1H, m), 1.87–1.97 (2H, m), 1.78–1.85 (2H, m), 1.62–1.72 (1H, m), 1.26–1.45 (66H, m), 0.88 (6H, t, J=6.7 Hz), ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ 173.2 (s), 101.5 (d), 76.7 (d), 73.0 (d), 72.5 (d), 71.6 (d), 71.0 (d), 70.3 (d), 68.7 (t), 62.7 (t), 51.4 (d), 36.8 (t), 34.4 (t), 32.1 (t), 30.4 (t), 30.2 (t), 30.03 (t), 30.00 (t), 29.93 (t), 29.87 (t), 29.81 (t), 29.76 (t), 29.6 (t), 26.5 (t), 26.4 (t), 22.9 (t), 14.3 (q)。

実施例2 O-α-D-ガラクトピラノシルー(1→2)-O-α-D-ガラクトピラノシルー(1→1)-(2S, 3S, 4R)-2-アミノ-N-[(R)-2-ヒドロキシテトラコサノイル]-1, 3, 4-オクタデカントリオール(S1140B-9)の単離および精製

沖縄県久米島近海の海底水深15～25mで採取された海綿を、凍結乾燥した粉末447.1gをクロロホルムとメタノールの混液で抽出し、抽出液を減圧下

濃縮して51.28gのエキスを得た。これを酢酸エチルと水で分配後、上層と中間層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下濃縮してそれぞれ18.37gと9.44gのフラクションを得た。上層より得たフラクションを10%水性メノールとn-ヘキサンとで分配したアルコール層と、中間層より得たフラクションを合わせて濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに繰り返して順相TLC上単一の活性成分を169.9mg得た。さらにODS-AMカラム(YMC製、250mm×20mm径、メタノール、9.0ml/min)を用いた逆相HPLCで精製し(保持時間:30.3分)、純粋な表題化合物(S1140B-9)を10.2mg得た。

なお、表題化合物は、F.Cafieri et al., Liebig's Ann. Chem. 1995, 1477-1481を参照し、単離、精製することもできる。

negative FABMS m/z 1007 $[(M-H)^-]$; IR;
 ^1H NMR (500MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 24°C) δ (ppm) 8.55 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$, NH), 5.60 (1H, d, $J=3.7\text{Hz}$, H1''), 5.57 (1H, d, $J=3.7\text{Hz}$, H1'''), 5.13 (1H, m, H2), 4.75 (1H, dd, $J=3.7, 10.4\text{Hz}$, H2''), 4.62 (2H, m), 4.54 (4H, m), 4.25-4.47 (10H, m), 2.17 (2H, m), 1.99 (1H, m), 1.87 (2H, m), 1.75 (1H, m), 1.65 (2H, m), 1.12-1.49 (60H, m), 0.85 (6H, m, terminal methyl); ^{13}C NMR (125MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 45°C) δ (ppm) 175.5 (s, C1'), 99.5 (d, C1'''), 98.6 (d, C1''), 76.7 (d, C2''), 76.0 (d, C3), 72.8 (d, C4), 72.6 (d, C5''), 72.6 (d, C4''), 72.5 (d, C2), 71.3 (d, C3'''), 71.0 (d), 70.8 (d), 70.5 (d, C2'''), 69.7 (d, C3''), 68.6 (t, C1), 62.7 (t), 62.5 (t), 51.2 (t, C2)

, 39.4 (t), 35.6 (t), 33.7 (t), 32.2 (t), 30.5 (t), 30.3 (t), 30.1 (t), 30.0 (t), 29.7 (t), 29.6 (t), 26.7 (t), 26.0 (t), 23.0 (t), 22.9 (t), 14.3 (q, terminal methyl)

実施例3

下記に記載の化合物は、その右側の文献に記載の方法に従って合成した。

化合物名	文献名
(2S, 3R) - 1 - (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-517)	WO 93/5055
(2S, 3R) - 1 - (α -D-グルコピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-563)	WO 94/9020
(2S, 3R) - 1 - (6' - デオキシ - α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-571)	WO 94/9020
(2S, 3R) - 1 - (β -L-アラビノピラノシルオキシ) - 2 - テトラデカノイルアミノ - 3 - オクタデカノール (AGL-577)	WO 94/9020
O - α -D-ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 6) - O - α -D-ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 1) - (2S, 3S, 4R) - 2 - アミノ - N - ヘキサコサノイル - 1, 3, 4 - オクタデカントリオール (AGL-586)	WO 94/24142
O - α -D-ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 6) - O - α -D-グルコピラノシル - (1 \rightarrow 1) - (2S,	WO 94/24142

3 S, 4 R) - 2 - アミノ - N - ヘキサコサノイル -

1, 3, 4 - オクタデカントリオール (AGL - 584)

O - α - D - ガラクトフラノシル - (1 \rightarrow 3) - O - WO 94 / 24142

α - D - ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 1) - (2 S,

3 S, 4 R) - 2 - アミノ - N - [(R) - 2 - ヒド

ロキシテトラコサノイル] - 1, 3, 4 - オクタデカ

ントリオール (719 - 7)

O - (N - アセチル - 2 - アミノ - 2 - デオキシ - α WO 94 / 24142

- D - カラクトピラノシル - (1 \rightarrow 3) - O - [α -

D - グルコピラノシル - (1 \rightarrow 2)] - O - α - D -

ガラクトピラノシル - (1 \rightarrow 1) - (2 S, 3 S, 4

R) - 2 - アミノ - N - [(R) - 2 - ヒドロキシテ

トラコサノイル] - 1, 3, 4 - オクタデカントリオ

ール (STL - 8)

式 (I) の化合物と上記実施例に記載の化合物との対応は、下記表 1 に示され
るとおりである。

33

表 1

化合物名	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
KRN7000	23	H	(b)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₂ OH
AGL517	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₂ OH
AGL563	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	H	OH	CH ₂ OH
AGL571	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₃
AGL577	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	H
AGL586	23	H	(b)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	基(A')
AGL584	23	H	(b)Y=13	H	OH	OH	H	H	OH	基(A')
S1140B-9	21	OH	(b)Y=13	H	基(A)	OH	H	OH	H	CH ₂ OH
719-7	21	OH	(b)Y=13	H	OH	基(E)	H	OH	H	CH ₂ OH
STL-8	23	OH	(b)Y=13	H	基(B)	基(F)	H	OH	H	CH ₂ OH

生物学的試験

薬理試験例1：KRN7000のNK細胞の腫瘍細胞障害活性増強作用

本発明の配糖体化合物の代表として、実施例1の化合物（KRN7000）を用いて以下の実験を行った。

RAG-1KO/ $V\alpha 14tg/V\beta 8.2tg$ マウス（このマウスのリンパ球画分にはB細胞、T細胞およびNK細胞が存在せず、NK細胞が多く存在する）にビヒクル（0.025 % ポリソルベート20含有生理食塩水）あるいはKRN7000 $100\mu g/kg$ を静脈内投与し、24時間後にそれぞれのマウスから脾臓を摘出し、定法により脾臓細胞を調製した。RAG-1KO/ $V\alpha 14tg/V\beta 8.2tg$ マウスは、RAG-1遺伝子を欠損させ、 $V\alpha 14$ および $V\beta 8.2$ 遺伝子を強制発現させることにより作製した（Kawano T. et al., Science, 278, 1626-1629 (1997)）。このマウスは千葉大学医学部、谷口克らより入手可能である。これらの脾臓細胞のマウスリンパ腫YAC-1細胞に対する細胞障害活性を4時間 ^{51}Cr -release 法（Kobayashi, E. et al., Oncology Res., 7, 529 (1995)）により検討した。結果を図1に示す。

図1に示すように、KRN7000投与マウスから調製した脾臓細胞は、ビヒクル投与マウスから調製した脾臓細胞に比べて、有意に高いYAC-1細胞に対する細胞障害活性を示した。

RAG-1KO/ $V\alpha 14tg/V\beta 8.2tg$ マウスの脾臓のリンパ球画分にはB細胞、T細胞およびNK細胞が存在せず、NK細胞が多く存在することを考え合わせると、この結果は、KRN7000が、脾臓のNK細胞の癌細胞に対する細胞障害活性を増強させる作用を有することを示す。

以上の結果より、KRN7000はNK細胞の腫瘍に対する細胞障害活性増強作用を有することが判明した。

薬理試験例2：KRN7000の脾臓のNK T細胞増加作用

ビヒクル（0.5% ポリソルベート20含有生理食塩水）あるいは1、10、および100 ng/kgのKRN7000をC57BL/6マウス（日本SLC（株））に静脈内投与を行い、その24時間後にそれぞれのマウスの脾臓を摘出し、定法により脾臓細胞を調製した。この脾臓細胞をプラスチックデッシュで30分間培養することにより、浮遊細胞を調製した。さらに、この浮遊細胞中のB細胞を除去することによりリンパ球画分を調製した。これらのリンパ球画分中のT細胞、NK細胞、NK T細胞および $V\alpha 14^+$ NK T細胞の解析は、FITC標識抗TCR $\alpha\beta$ モノクローナル抗体（ファーマンジェン（Pharmingen）社）、Cychrome標識抗NK1.1モノクローナル抗体（ファーマンジェン社）、およびPE標識抗 $V\alpha 14$ モノクローナル抗体を用いた3-color FACS解析により行った（図2）。抗 $V\alpha 14$ モノクローナル抗体は、抗 $V\alpha 14$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ（CMS-1：千葉大学医学部、谷口克らより入手可能）をヌードマウスに移植し、腹水を回収し精製することによって得た。図2AおよびB中、リンパ球画分中のNK1.1細胞、TCR $\alpha\beta$ 細胞、および $V\alpha 14$ 細胞の量を、これらの細胞に対する標識化抗体の蛍光強度として表した。

図2Aに示すように、KRN7000を100 ng/kg投与すると、ビヒクル投与に比べ、脾臓リンパ球画分中のNK1.1 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ 細胞の割合の顕著な増加が観察された。

また、図2Bに示すように、NK1.1 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ 細胞中の $V\alpha 14^+$ 細胞の割合を検討したところ、上記の用量のKRN7000を投与した場合には、ビヒクル投与に比べ、NK1.1 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ 細胞中の $V\alpha 14^+$ 細胞の割合が明らかに増加することが判明した。

更に、図2Cに示すように、KRN7000を10および100 ng/kg投与することにより、脾臓リンパ球画分中のNK細胞数はビヒクル投与マウスのそ

れと同じであったが、脾臓リンパ球画分の細胞数および脾臓リンパ球画分中のT細胞数は、ビヒクル投与マウスのそれらの約2倍に増加した。さらに、脾臓リンパ球画分中の $V\alpha 14^{-}$ NK T細胞数および $V\alpha 14^{+}$ NK T細胞数がビヒクル投与マウスのそれらのそれぞれ3倍以上（データ省略）および4倍以上に増加した。

更にまた、肝臓中のT細胞、NK細胞、 $V\alpha 14^{-}$ NK T細胞および $V\alpha 14^{+}$ NK T細胞の解析も行ったところ、脾臓の場合と同様に $V\alpha 14^{-}$ NK T細胞数および $V\alpha 14^{+}$ NK T細胞数が顕著に増加することも判明した（データ省略）。

以上の結果から、KRN7000は、生体中のNK T細胞数、特に $V\alpha 14^{+}$ NK T細胞数、を増加させる作用を有することが判明した。

薬理試験例3：KRN7000のMRL lpr/lpr マウスのリンパ腫脹抑制作用

メスのMRL lpr/lpr マウス (Sakamoto, A. Clin. Immunol., 28, 1558(1996)) を1群10匹として以下の実験を行った。6週齢で購入した21匹のMRL マウスの観察を行っていたところ、10週齢に達した時に、1匹のマウスに腋下リンパ節の腫脹が認められた。そこで、他の20匹のマウスを無作為に2群に分けた。そして、マウスが11週齢に達した時点より、上記の2群に対してビヒクル（0.025% ポリソルベート20含有生理食塩水）あるいはKRN7000（100 μ g/kg）の週2回（火曜日と金曜日）の腹腔内投与を開始した。1週間に2度、腋下および鼠径部リンパ節の触診を行うことにより、リンパ腫脹の進展を経時的に観察した。各リンパ節をその大きさにより、- (0)、+ (1)、++ (2)、+++ (3) の4段階にスコア化し、各マウスの左右の腋下あるいは鼠径部リンパ節のスコアの合計をリンパ腫脹 indexとして、図3に示した。

図3Aに示すように、KRN7000投与により、MRL マウスの加齢に伴う腋下リンパ腫脹が明らかに抑制された。また、図3Bに示すように、MRL マウスの

加齢に伴う鼠径部リンパ腫脹も明らかに抑制された。すなわち、KRN7000は、MRL マウスのリンパ腫脹を抑制する作用を有することが明らかとなった。

MRL マウスはヒト全身性エリテマトーデスのモデルマウスである(Sakamoto, A. Clin. Immunol., 28, 1558(1996))。従って、以上の結果は、KRN7000が全身性エリテマトーデスの治療に有効であることを示す。

薬理試験例4：KRN7000のMRL lpr/lprマウスの生存率に対する効果

メスのMRL lpr/lprマウスを1群10匹として以下の実験を行った。4週齢で購入したMLRマウスを無行為に2群(10匹/群)に分けた。5週齢に達した時点より、ビヒクル(0.025%ポリソルベート20含有生理食塩水)あるいはKRN7000(100 μ g/kg)の週2回の腹腔内投与を開始した。各マウスの生死の観察を毎日行った。

図4に示すように、ビヒクル投与群は、投与開始後250日以内に全例死亡したのに対し、KRN7000は、投与開始350日後でも、3匹のマウスが生存した。

薬理試験例5：KRN7000の4%DSS誘発マウス大腸炎抑制作用

CDF1マウス(6週齢、メス)(日本SLC(株))を1群10匹として以下の実験を行った。DSS(dextran sodium sulfate)を飲料水に4%(w/v)の割合で溶解した4%DSS溶液を飲料水として与え始めた日を第0日とする。KRN7000 100 μ g/kgを第1、5、9日目に腹腔内投与する群、IL-12 1 μ g/マウスを第1、3、5、7、9日目に腹腔内投与する群、および無処理群(コントロール)の3群に分けて、各マウスの体重測定および生死の観察を毎日行った。各群の体重の変動を図5A、生存期間を図5Bに示した。

図5Aに示すように、IL-12投与群では、無処理群に比べて、非常に早期から体重の減少が観察された。しかし、KRN7000を投与した群では、無処理群に比べ、体重減少の始まる時期が明らかに遅延した。

また、図5 Bに示すように、IL-12 投与群では、マウスの生存期間は無処理群に比べて有意に短かった。しかし、KRN7000投与群では、無処理群に比べて、有意な生存期間延長が認められた。

4% DSS誘発マウス大腸炎はヒト潰瘍性大腸炎のモデルである (Elson, C. et al., Gastroenterology, 109, 1344(1995))。従って、以上の結果は、KRN7000が潰瘍性大腸炎の治療に有効であることを示す。

薬理試験例6： α -グリコシルセラミド構造を有する化合物のNK T細胞増殖促進作用

薬理試験例1に示したRAG-1 KO/ $V\alpha 14tg/V\beta 8.2tg$ マウスの脾臓細胞を用いて、 α -グリコシルセラミド構造を有する化合物のNK T細胞増殖促進作用を検討した。

RAG-1 KO/ $V\alpha 14tg/V\beta 8.2tg$ マウスの脾臓細胞より常法に従って、脾臓細胞を調製した。この脾臓細胞を10% FCS添加RPMI 1640培地に 2×10^6 個/mlに浮遊させ、96穴丸底プレートに100 μ lずつ添加した。図12に示した10種類の α -グリコシルセラミド構造を有する化合物を最終濃度が1、10、100ng/mlとなるように上記プレートに添加し、2日間培養した。 [3 H] チミジン(0.5 μ Ci/well) を添加し、16時間後に細胞を収集し、細胞内に取り込まれた [3 H] チミジンの量を液体シンチレーションカウンターで測定した。結果を表2に示す。

サ ン プ ル	[³ H] チミジン取り込み量 (cpm)		
	1	10	100 (ng/ml)
ビヒクル	2090	2056	2014
KRN7000	40064	74669	102543
AGL517	3176	15583	83169
AGL563	2063	3773	13131
AGL571	3969	17848	118092
AGL577	2083	7792	49701
AGL586	5137	39750	102425
AGL584	29331	65084	96783
S1140B-9	3387	10265	49520
719-7	5287	30179	60528
STL-8	4761	26474	47141

表2に示すように上記のすべての化合物は、100ng/mlの濃度ではビヒクル添加群に比べて有意なNK T細胞増殖促進作用を有することが判明した。

以上の結果は α -D-グリコシルセラミド構造を有する配糖体、および糖部分に他の糖が結合した α -D-グリコシルセラミド構造を有する配糖体が、自己免疫疾患の治療に有効であることを示す。

薬理試験7：KRN7000による実験的自己免疫性脳脊髄炎発症の抑制

C57BL/6マウス（6週齢、メス）を1群10匹として以下の実験を行った。200 μ gのミエリンオリゴ希突起膠細胞糖タンパク質（Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein）の部分ペプチド（MOG33-55）と500 μ gの結核菌（Mycobacterium tuberculosis）H37Raを不完全フロイントアジュバンドに加えてエマルジョンを作製し、第0日目と7日目に各マウスの皮下に注射して免疫を行った。さらに、第0日目と第2日目に500ngの百日咳毒（pertussis toxin）をマウスの腹腔内に投与し、マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発症を誘導した。KRN7000 20 μ g/kgを第1、5、8、12、15日目に腹腔内投与する群およびビヒクル（0.5%、ポ

リソルベート20)を投与する群の2群に分けて、各マウスのEAEの発症の程度を毎日観察した。各群の各マウスのEAEの発症の程度を図6に示した。

図6に示すように、ビヒクル投与群(図6A)では、最初のMOGペプチドによる免疫から15日以内に、全例のマウスがEAEを発症し、その内の80%のマウスが死亡した。しかし、KRN7000を投与した群(図6B)では、10匹中4匹のマウスEAEが発症し、その内の2匹が死亡したのみであった。

以上の結果により、KRN7000は、マウスにおけるEAEの発症を抑制することが判明した。このEAEは、ヒト多発性硬化症(MS)のモデルである(Autoimmune Disease Models, edited by Cohen I. R. & Miller A. Academic Press, Inc. (1994), Chapter 1, pp1)。従って、以上の結果は、KRN7000が多発性硬化症の治療に有効であることを示す。

薬理試験8：KRN7000のマウス糖尿病の発症抑制作用

NOD/ShiJic(NOD)マウス(6週齢、メス)(日本クレア(株))を1群10匹として以下の実験を行った。NODマウスは、加齢とともに糖尿病を発症する。KRN7000 100 μ g/kgを7週齢より週2回腹腔内投与する群および無処理群の2群に分けて、各マウスの糖尿病の発症の有無を毎週調べた。血糖値はGlucometer(マイルス三共)を用いて測定し、200mg/dL以上の値を連続して2回示した個体を糖尿病とした。各群の糖尿病発症マウスの割合を図7に示した。

図7に示すように、無処理群では、35週齢に達した時点で、80%のマウスが糖尿病を発症したが、KRN7000を投与した群では、35週齢に達した時点においても、一匹のマウスも糖尿病を発症しなかった。

以上の結果から、KRN7000は、NODマウスにおける糖尿病の自然発症を抑制することが判明した。このNODマウスは、ヒトI型糖尿病のモデルである(Autoimmune Disease Models, edited by Cohen I. R. & Miller A. Academic Press, Inc. (1994), Chapter 1, pp1)。

c Press, Inc. (1994), Chapter 9, pp149)。従って、以上の結果はKRN7000がI型糖尿病の治療に有効であることを示す。

薬理試験9：KRN7000の $V\alpha 24^+$ NKT細胞増殖促進作用

健丈人の末梢血単核球細胞を10%FCS添加AIM培地を用い、GM-CSF (400 U/ml)、IL-4 (200 U/ml) およびKRN7000 (100 ng/ml) を添加し、4日間培養することにより、抗原提示細胞を調製した。

これらの抗原提示細胞を刺激細胞とし、同じ人の末梢血単核球細胞を応答細胞として、自己混合リンパ球反応 (autologous mixed leukocyte reaction: MLR) を行った。10日間培養した後、IL-2 (5 U/ml) を添加し、さらに、4日間培養を行い、細胞の回収を行った。さらに、この回収した細胞中のCD4、CD8二重ネガティブ細胞を回収し、その表現型の解析を行った。表現型の解析は、種々の表現型を示す細胞に対する標識化抗体の蛍光強度として表した。その結果を、図8に示す。

図8に示すように、これらの細胞群には、 $CD4^-CD8^-CD3^+V\alpha 24^+V\beta 11^+NKRP1A^+$ の表現型を有する細胞 ($V\alpha 24^+$ NKT細胞のサブセット) が大多数存在することが判明した。

上記の細胞群をIL-2 (5 U/ml) を用いて培養し、 $V\alpha 24^+$ NKT細胞を増殖させて、以下の自己混合リンパ球反応において応答細胞として用いた。同じ末梢血単核球細胞をGM-CSF + IL4およびKRN7000 100 ng/ml、AGL-583 (β -ガラクトシルセラミド、 β -GalCer) あるいは0.1%DMSO (ビヒクル) を添加し、4日間培養することにより、抗原提示細胞を調製した。これらの抗原提示細胞を刺激細胞として自己混合リンパ球反応を行った。2日間培養後、 $[^3H]$ ミチジン (0.5 $\mu Ci/ml$) を添加し、8時間後に細胞を収集し、細胞内に取り込まれた $[^3H]$ チミジンの量を

液体シンチレーションカウンターで測定した。結果を図9に示す。

図9に示すように、ビヒクルおよび β -ガラクトシルセラミドで処理した抗原提示細胞は $V\alpha 24^+$ NK T細胞の増殖に何ら影響を与えなかったが、KRN7000で処理した抗原提示細胞の場合には、顕著な、抗原提示細胞の数依存的な $V\alpha 24^+$ NK T細胞の増殖促進作用が観察された。さらに、抗CD1a、CD1b、CD1c、CD1d抗体を用いて、上記のKRN7000で処理した抗原提示細胞による $V\alpha 24^+$ NK T細胞の増殖促進作用に対する阻害実験を行ったところ、抗CD1d抗体によってのみ、 $V\alpha 24^+$ NK T細胞の増殖促進作用が阻害された（データ省略）。

以上の結果から、KRN7000は、マウスの $V\alpha 14^+$ NK T細胞に相当するヒトの $V\alpha 24^+$ NK T細胞の増殖を促進させる効果を有することが判明した。I型糖尿病の進展した患者では $V\alpha 24^+$ NK T細胞の数が極端に少ないという最近の報告（Wilson et al., Nature, 391, 177(1998)）、および薬理試験3、7および8の結果を考えあわせると、上記の結果は、KRN7000はヒトの $V\alpha 24^+$ NK T細胞が関係している全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、多発性硬化症あるいはI型糖尿病等の自己免疫疾患の予防や治療に有効であることを強く示している。

薬理試験例10：KRN7000の流産促進作用

C57BL/6マウス（日本SLC（株））を用いて実験を行なった。膣栓を確認した日を第0日目とする。妊娠マウスを1群6匹として、KRN7000 $150\mu\text{g}/\text{kg}$ を第7、8、9日目に静脈内投与する群とPBS（phosphate buffer saline）をそれらの日に静脈内投与する群に分けた。第12日目に子宮を剖出し、胎児の状態を観察した。

PBS投与群では、合計53の胎児（embryo）のうち、死亡吸収されている胎児は3匹で、5.6%の流産率であり、C57BL/6マウスの自然流産率（約

5%とよく一致した。

KRN7000投与群では、合計36の胎児のうち、死亡吸収されている胎児は、12匹で、流産率は33%と、無処理群に比べて明らかに高い値を示した。

一方、KRN7000を同用量、同スケジュールで、 $V\alpha 14^+$ NK T欠損 ($J\alpha 281KO$) マウス (Kawano T. et al., Science, 278, 1626-1629(1997)) に投与したところ、流産率は、5.3%であり、PBS投与群の流産率 (5.0%) と同等であった。 $V\alpha 14^+$ NK T欠損マウスは千葉大医学部、谷口克らより入手可能である。

KRN7000がNK T細胞を活性化する作用を有することを考え合わせると、NK T細胞の活性化と流産促進作用は、良好な相関関係を示すことが示された。

また、IL-12もNK T細胞を活性化することが知られているが、IL-12を同用量、同スケジュールでマウス ((CBA×DBA/2) F₁) に投与すると、34%の割合で流産が観察された。この結果は上記の相関関係を強く支持する。

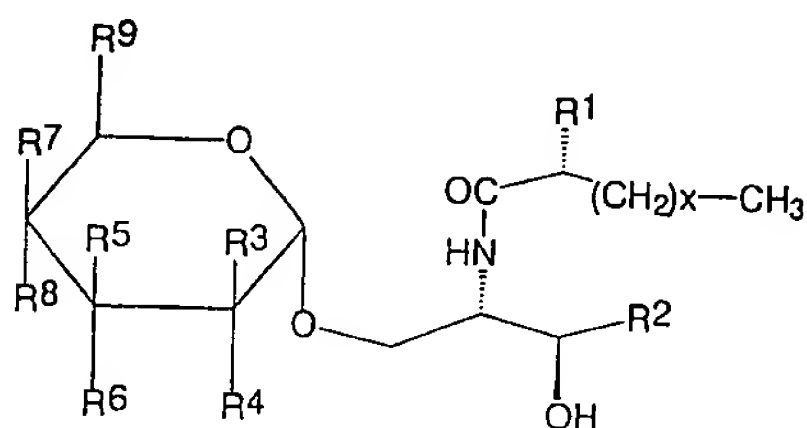
以上の結果から、KRN7000およびIL-12は、流産促進作用を有することが判明した。

薬理試験例11：単回投与による急性毒性試験

マウスに対して実施例1の化合物を静脈内投与した。その結果、LD50値は10 mg/kg以上であった。また、10 mg/kgで何等特別の症状を示さず低毒性であった。

請 求 の 範 囲

1. 式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を含むNK T細胞活性化用組成物。



(I)

(上記式中、

R^1 はHまたはOHであり、

Xは7～27のいずれかの整数であり、

R^2 は下記(a)～(e)からなる群から選択される置換基であり(ここで、Yは5～17のいずれかの整数である)、

(a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

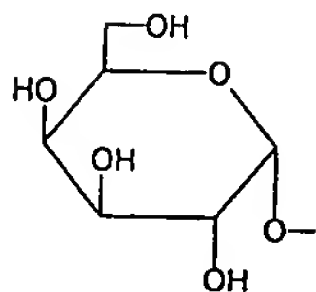
(d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、そして

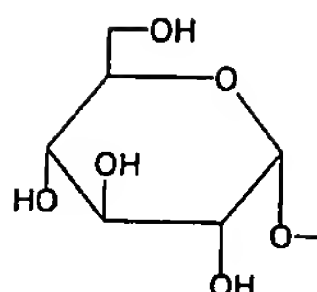
$R^3 \sim R^9$ は下記のi)～v)のいずれかで定義される置換基である：

i) R^3 、 R^6 、および R^8 がHのとき

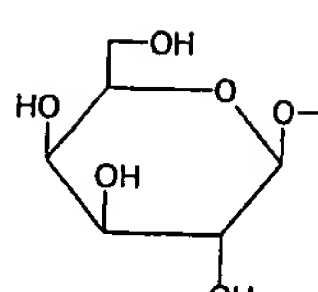
R^4 はH、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、または下記基(A)～(D)：



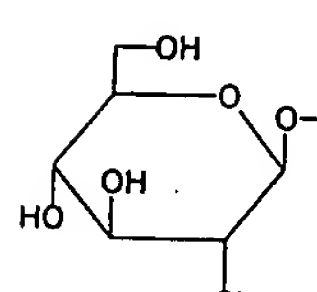
(A)



(B)



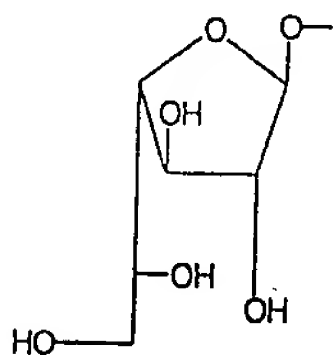
(C)



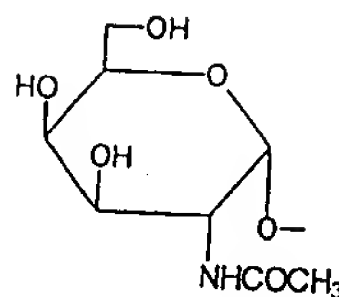
(D)

からなる群から選択される置換基であり、

R^5 はOH、または下記基 (E) および (F) :



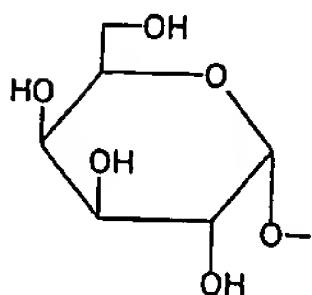
(E)



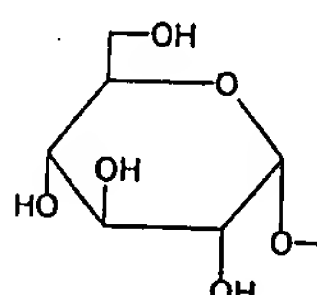
(F)

からなる群から選択される置換基であり、

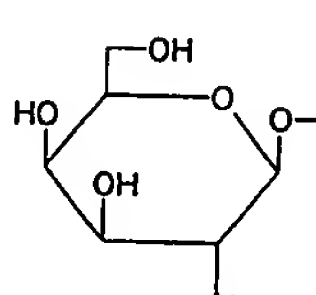
R^7 は、OHまたは下記基 (A) ~ (D) :



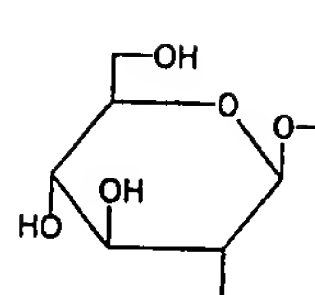
(A)



(B)



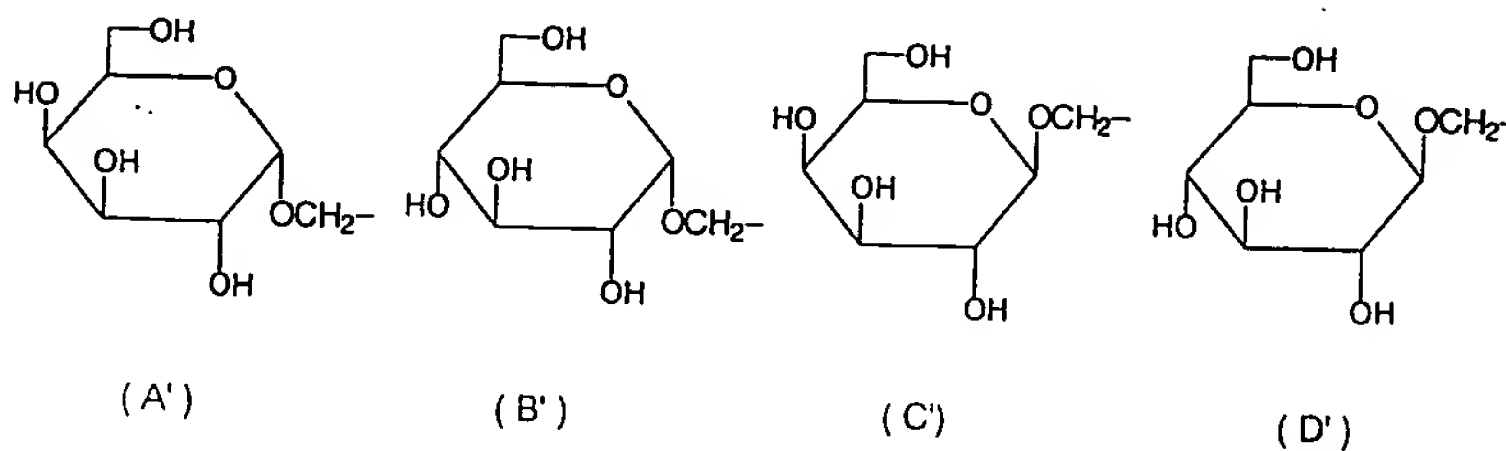
(C)



(D)

からなる群から選択される置換基であり、

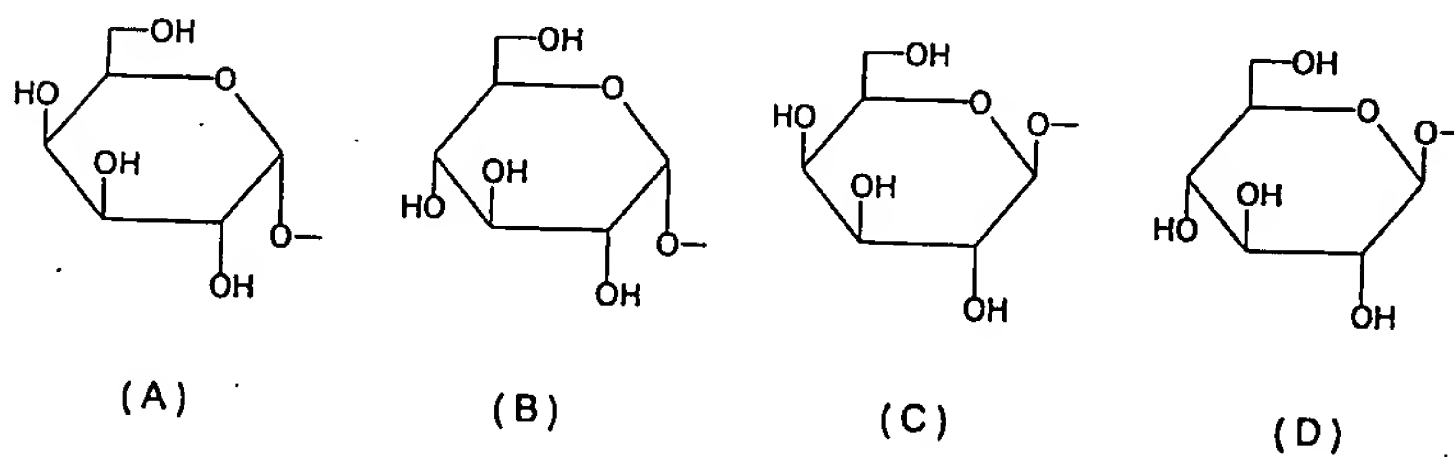
R^9 はH、 CH_3 、 CH_2OH 、または下記基 (A') ~ (D') :



からなる群から選択される置換基である ;

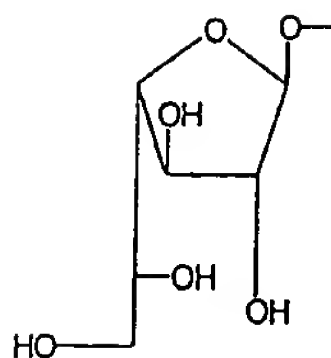
ii) R^3 、 R^6 および R^7 がHのとき

R^4 はH、OH、 NH_2 、 $NHCOCH_3$ 、または下記基 (A) ~ (D) :

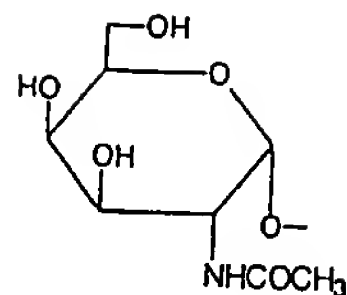


からなる群から選択される置換基であり、

R^5 はOH、または下記基 (E) および (F) :



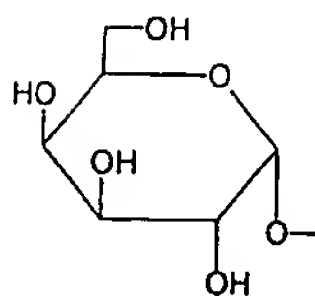
(E)



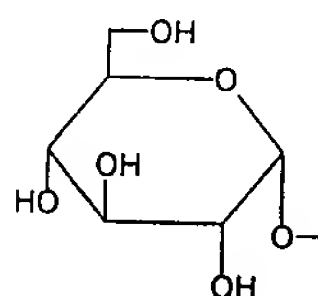
(F)

からなる群から選択される置換基であり、

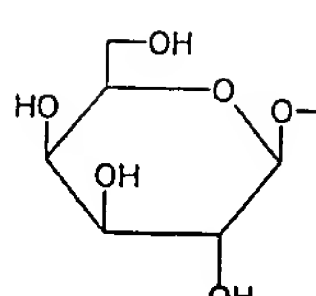
R^8 はOH、または下記基 (A) ~ (D) :



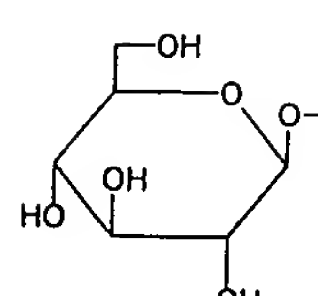
(A)



(B)



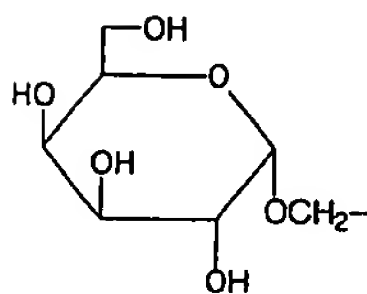
(C)



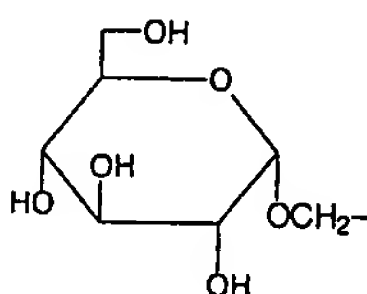
(D)

からなる群から選択される置換基であり、

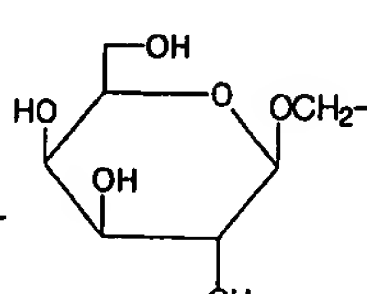
R^9 はH、 CH_3 、 CH_2OH または下記基 (A') ~ (D') :



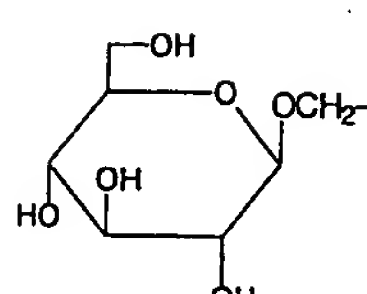
(A')



(B')



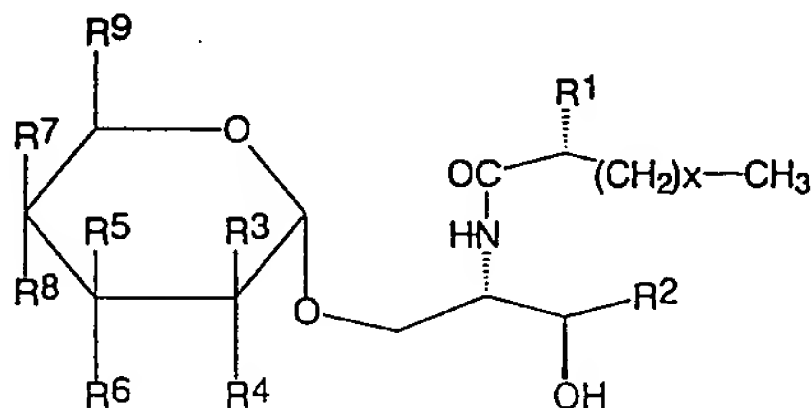
(C')



(D')

からなる群から選択される置換基である。)

2. 式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を有効成分として含む、自己免疫疾患治療用医薬組成物。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項1において定義した通りである。)

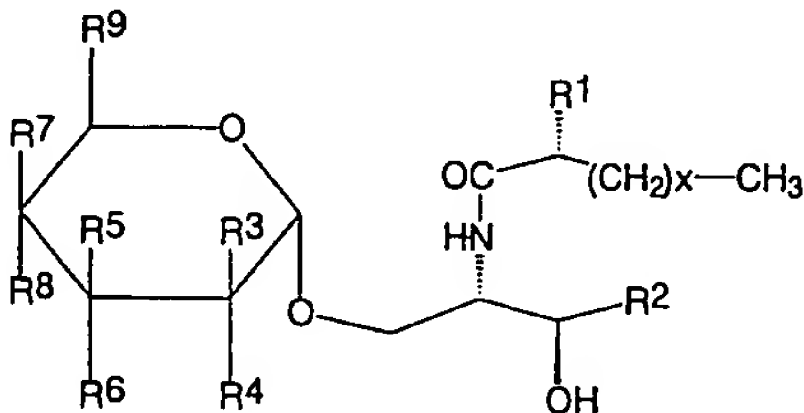
3. 自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデスまたは全身性強皮症である、請求項2に記載の医薬組成物。

4. 自己免疫疾患が、潰瘍性大腸炎である、請求項2に記載の医薬組成物。

5. 自己免疫疾患が、脳脊髄炎または多発性硬化症である、請求項2に記載の医薬組成物。

6. 自己免疫疾患が、I型糖尿病である、請求項2に記載の医薬組成物。

7. 式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を有効成分として含む、墮胎用医薬組成物。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項 1 において定義した通りである。)

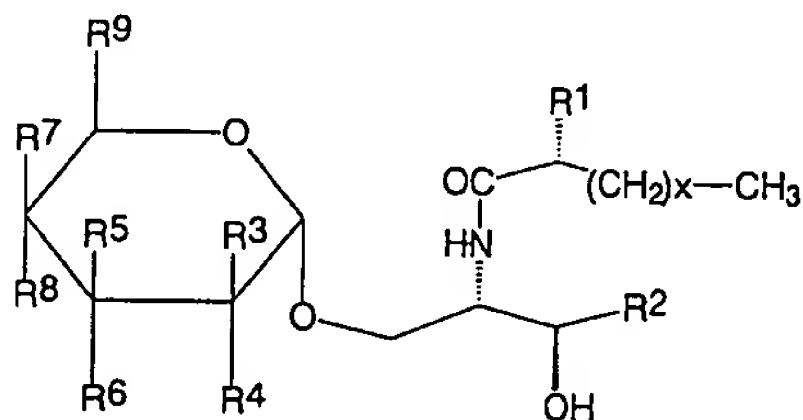
8. 式 (I) の化合物中、 R^3 、および R^6 が H を表し、 R^4 が OH または基 (A) ~ (D) のいずれかの置換基を表し、 R^5 が OH または基 (E) もしくは (F) の置換基を表し、 R^7 および R^8 がそれぞれ H または OH のいずれかを表し (但し、 R^7 および R^8 の両方が同一の基を表すことはない)、 R^9 が CH_2OH 、 CH_3 、 H 、または基 (A') ~ (D') のいずれかの置換基を表す、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

9. 式 (I) の化合物中、 X が 21 ~ 25 の整数であり、 R^2 が置換基 (b) (式中、 Y は 11 ~ 15 である) を表す、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

10. 式 (I) の化合物中、 X が 9 ~ 13 の整数であり、 R^2 が置換基 (a) (式中、 Y は 11 ~ 15 である) を表す、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

11. 式 (I) の化合物が、(2S, 3S, 4R) - 1 - (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2-ヘキサコサノイルアミノ-3, 4-オクタデカンジオールである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

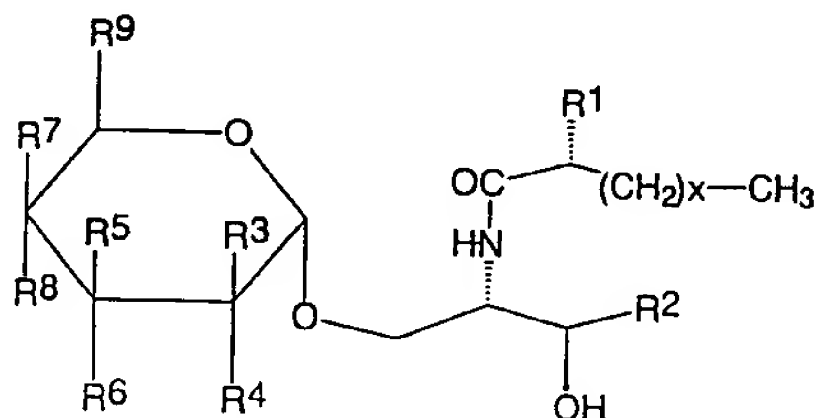
12. 式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物の、NKT細胞活性化剤の製造のための使用。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項 1 において定義した通りである。)

13. 式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物の、自己免疫疾患治療用薬剤の製造のための使用。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項 1 において定義した通りである。)

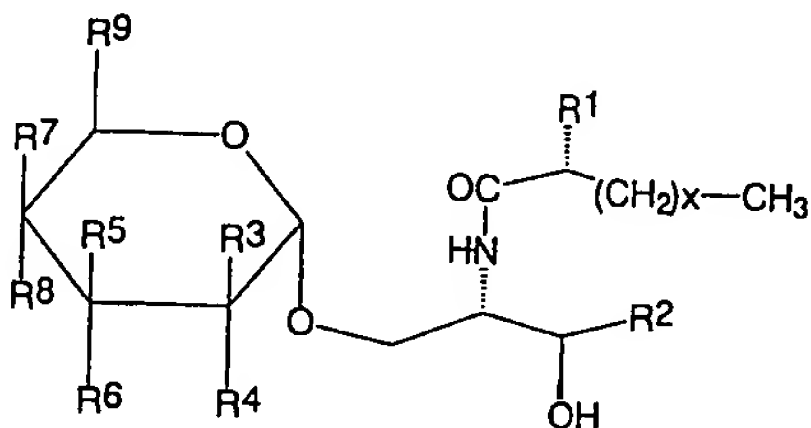
14. 自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデスまたは全身性強皮症である、請求項 13 に記載の使用。

15. 自己免疫疾患が、潰瘍性大腸炎である、請求項 13 に記載の使用。

16. 自己免疫疾患が、脳脊髄炎または多発性硬化症である、請求項 13 に記載の使用。

17. 自己免疫疾患が、I 型糖尿病である、請求項 13 に記載の使用。

18. 式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物の、墮胎剤の製造のための使用。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項 1 において定義した通りである。)

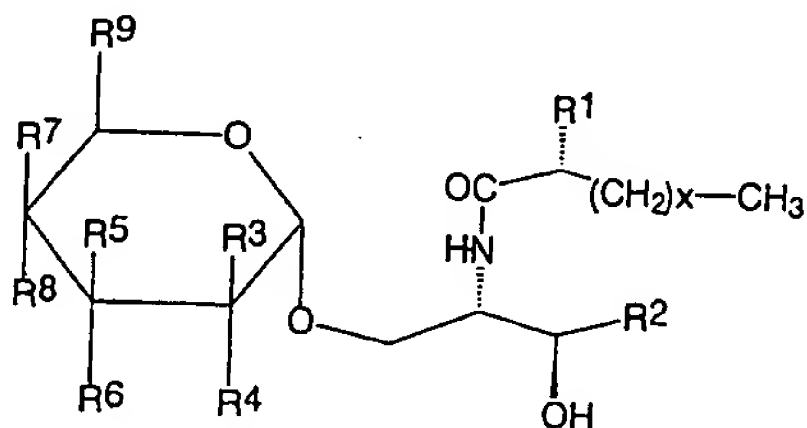
19. 式 (I) の化合物中、 R^3 、および R^6 が H を表し、 R^4 が OH または基 (A) ~ (D) のいずれかの置換基を表し、 R^5 が OH または基 (E) もしくは (F) の置換基を表し、 R^7 および R^8 がそれぞれ H または OH のいずれかを表し (但し、 R^7 および R^8 の両方が同一の基を表すことはない)、 R^9 が CH_2OH 、 CH_3 、 H 、または基 (A') ~ (D') のいずれかの置換基を表す、請求項 12 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用。

20. 式 (I) の化合物中、 X が 21 ~ 25 の整数であり、 R^2 が置換基 (b) (式中、 Y は 11 ~ 15 である) を表す、請求項 12 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用。

21. 式 (I) の化合物中、 X が 9 ~ 13 の整数であり、 R^2 が置換基 (a) (式中、 Y は 11 ~ 15 である) を表す、請求項 12 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用。

22. 式 (I) の化合物が、(2S, 3S, 4R) - 1 - (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2-ヘキサコサノイルアミノ-3, 4-オクタデカンジオールである、請求項 12 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用。

23. 式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物により活性化された NK T 細胞。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項 1 において定義した通りである。)

24. NKT細胞がヒト $V\alpha 24^+$ NKT細胞である、請求項 23 に記載の活性化NKT細胞。

25. NKT細胞を式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物の存在下インビトロで培養することにより得ることができる、請求項 23 に記載の活性化NKT細胞。

26. 式 (I) の化合物中、 R^3 、および R^6 が H を表し、 R^4 が OH または基 (A) ~ (D) のいずれかの置換基を表し、 R^5 が OH または基 (E) もしくは (F) の置換基を表し、 R^7 および R^8 がそれぞれ H または OH のいずれかを表し (但し、 R^7 および R^8 の両方が同一の基を表すことはない)、 R^9 が CH_2OH 、 CH_3 、H、または基 (A') ~ (D') のいずれかの置換基を表す、請求項 23 ~ 25 のいずれか一項に記載のNKT細胞。

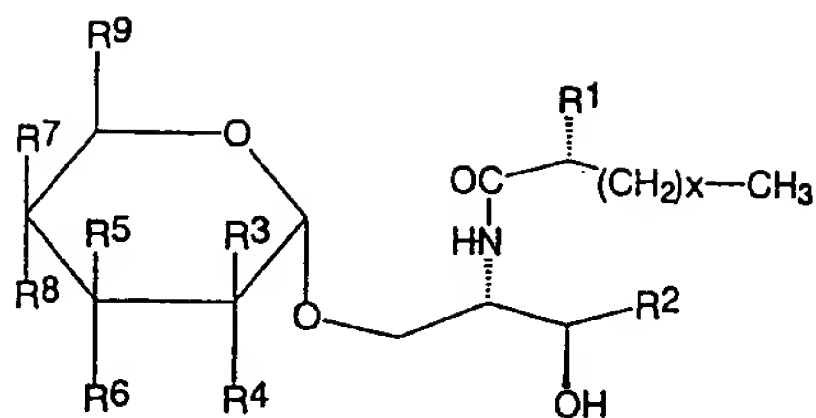
27. 式 (I) の化合物中、 X が 21 ~ 25 の整数であり、 R^2 が置換基 (b) (式中、 Y は 11 ~ 15 である) を表す、請求項 23 ~ 25 のいずれか一項に記載のNKT細胞。

28. 式 (I) の化合物中、 X が 9 ~ 13 の整数であり、 R^2 が置換基 (a) (式中、 Y は 11 ~ 15 である) を表す、請求項 23 ~ 25 のいずれか一項に記載のNKT細胞。

29. 式 (I) の化合物が、(2S, 3S, 4R) - 1 - (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - ヘキサコサノイルアミノ - 3, 4 - オクタデカンジオールである、請求項 23 ~ 25 のいずれか一項に記載のNKT細胞。

30. NKT細胞を式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物の存在下インビトロで培養することを含む、NKT細胞の活性化法。

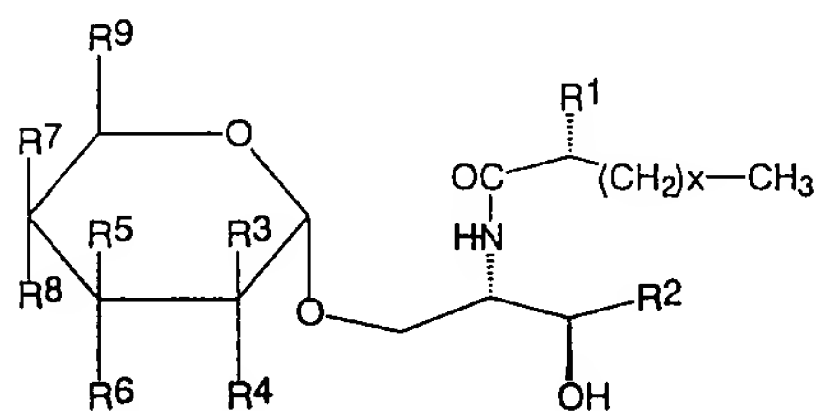
53



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項 1 において定義した通りである。)

31. 式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を、ヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、自己免疫疾患の治療法。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項 1 において定義した通りである。)

32. 請求項 23 に記載の活性化 NK T 細胞をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、自己免疫疾患の治療法。

33. 投与が、活性化 NK T 細胞をヒトを含む哺乳動物の体内に移植することにより行われる、請求項 32 に記載の治療法。

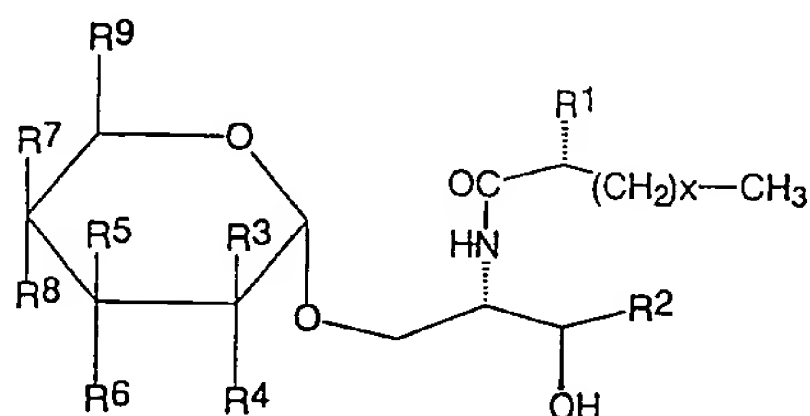
34. 自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデスまたは全身性強皮症である、請求項 31 または 32 に記載の治療法。

35. 自己免疫疾患が、潰瘍性大腸炎である、請求項 31 または 32 に記載の治療法。

36. 自己免疫疾患が、脳脊髄炎または多発性硬化症である、請求項31または32に記載の治療法。

37. 自己免疫疾患が、I型糖尿病である、請求項31または32に記載の治療法。

38. 式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を、ヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、堕胎法。



(I)

(上記式中、 $R^1 \sim R^9$ および X は請求項1において定義した通りである。)

39. 式(I)の化合物中、 R^3 、および R^6 がHを表し、 R^4 がOHまたは基(A)～(D)のいずれかの置換基を表し、 R^5 がOHまたは基(E)もしくは(F)の置換基を表し、 R^7 および R^8 がそれぞれHまたはOHのいずれかを表し(但し、 R^7 および R^8 の両方が同一の基を表すことはない)、 R^9 が CH_2OH 、 CH_3 、H、または基(A')～(D')のいずれかの置換基を表す、請求項30～38のいずれか一項に記載の方法。

40. 式(I)の化合物中、 X が21～25の整数であり、 R^2 が置換基(b)(式中、 Y は11～15である)を表す、請求項30～38のいずれか一項に記載の方法。

41. 式(I)の化合物中、 X が9～13の整数であり、 R^2 が置換基(a)(式中、 Y は11～15である)を表す、請求項30～38のいずれか一項に記載の方法。

載の方法。

42. 式(I)の化合物が、(2S, 3S, 4R)-1-(α -D-ガラクトピラノシルオキシ)-2-ヘキサコサノイルアミノ-3, 4-オクタデカンジオールである、請求項30～38のいずれか一項に記載の方法。

1 / 12

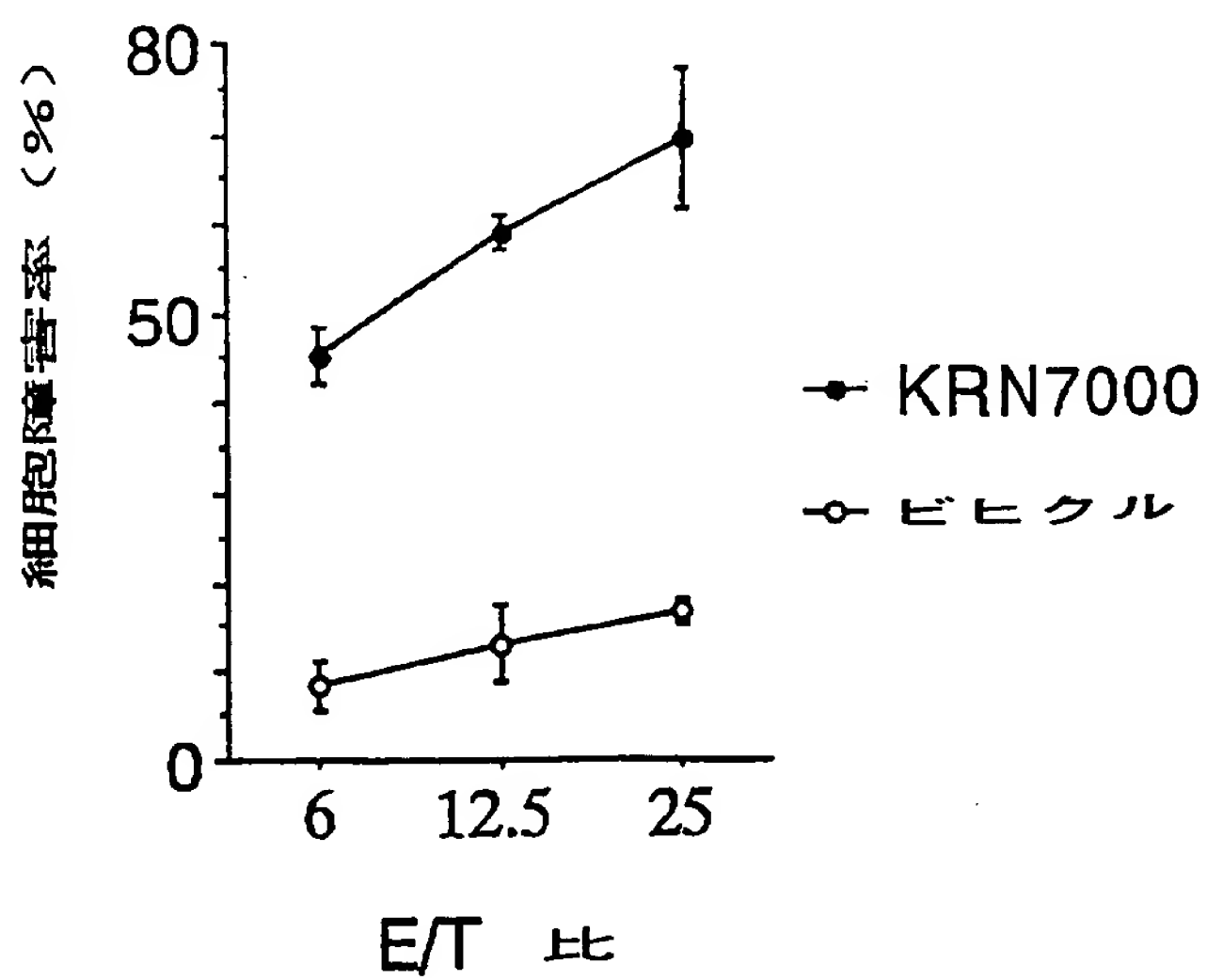


FIG. 1

2 / 12

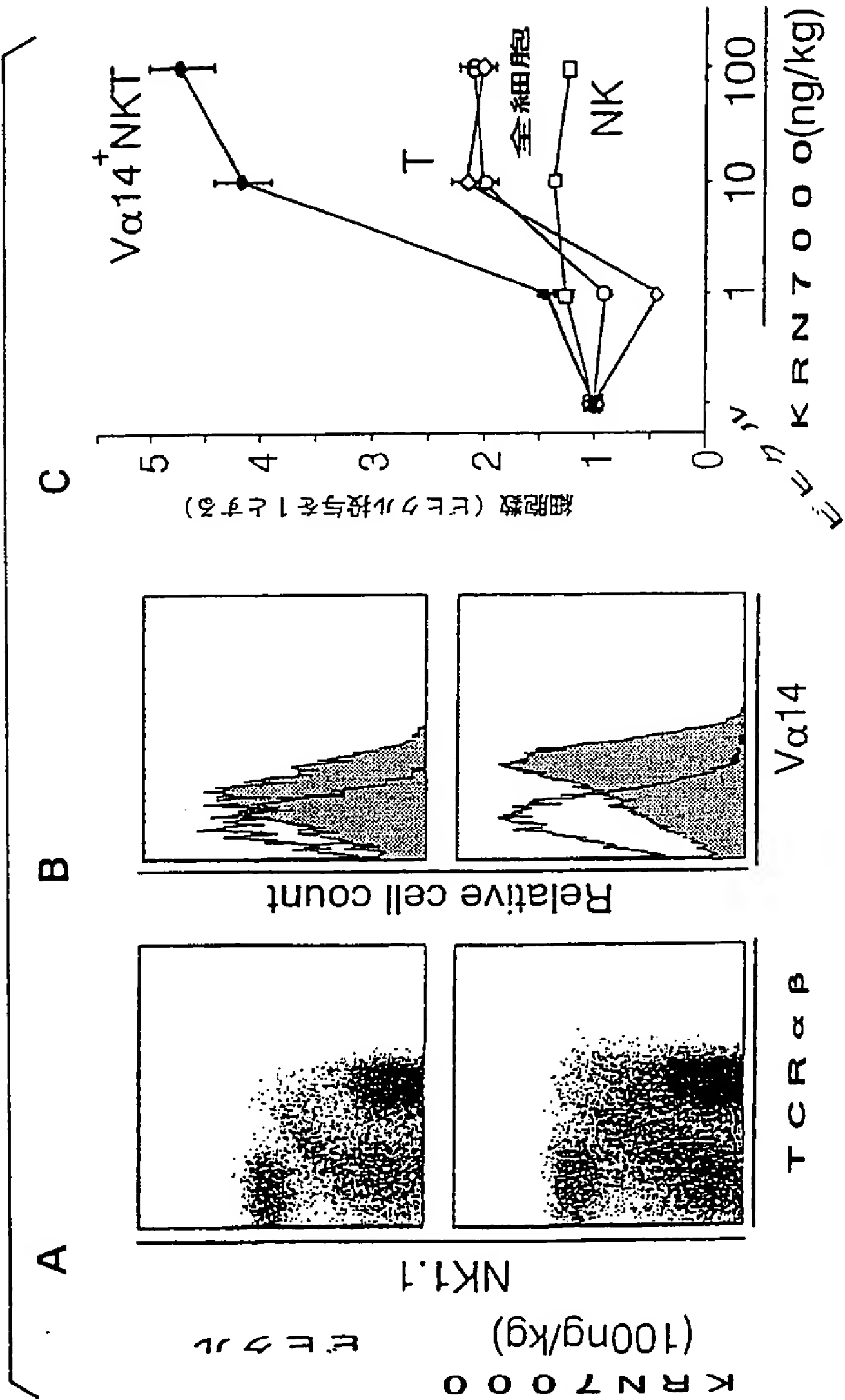


FIG. 2

3/12

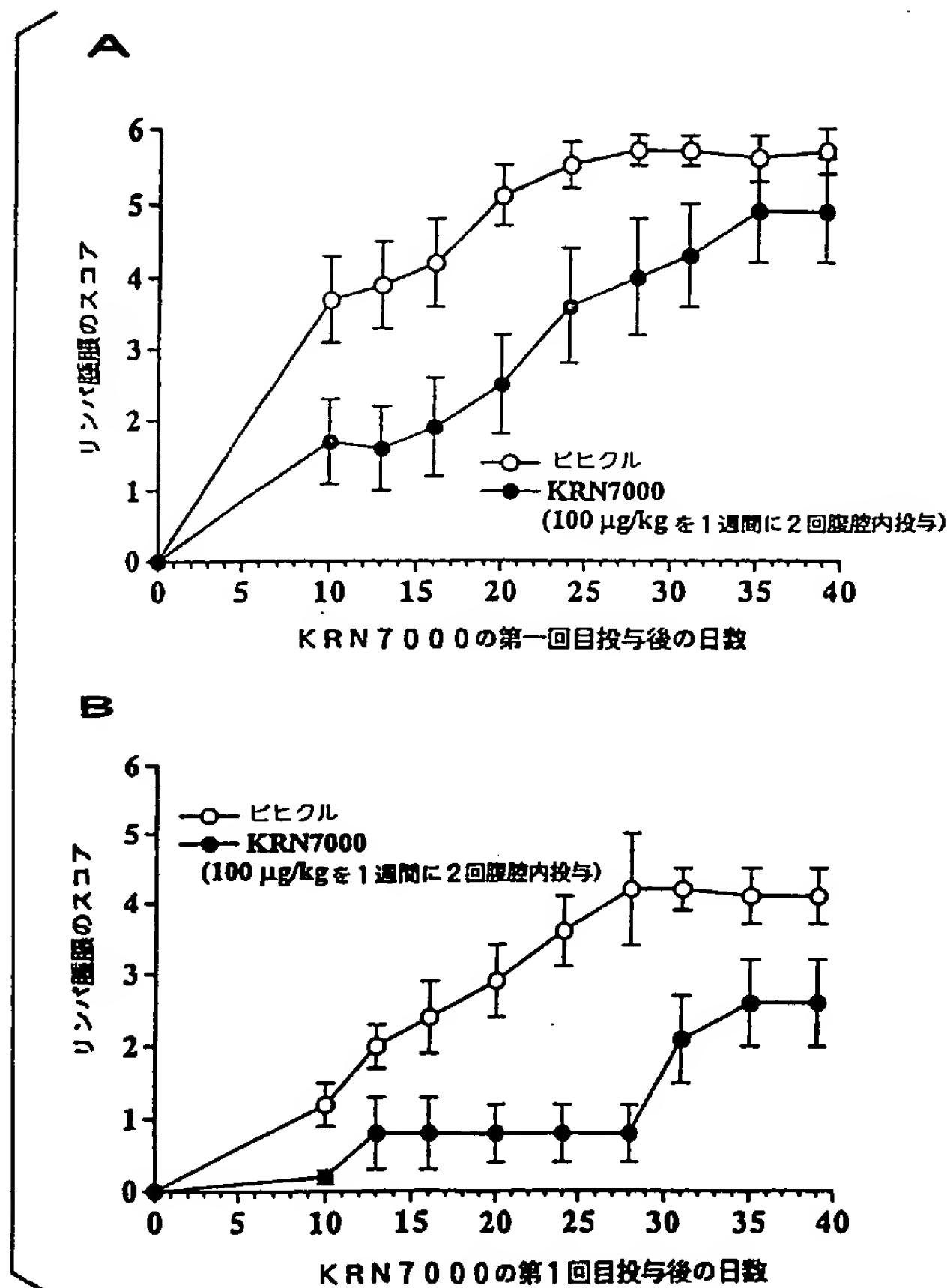


FIG. 3

4/12

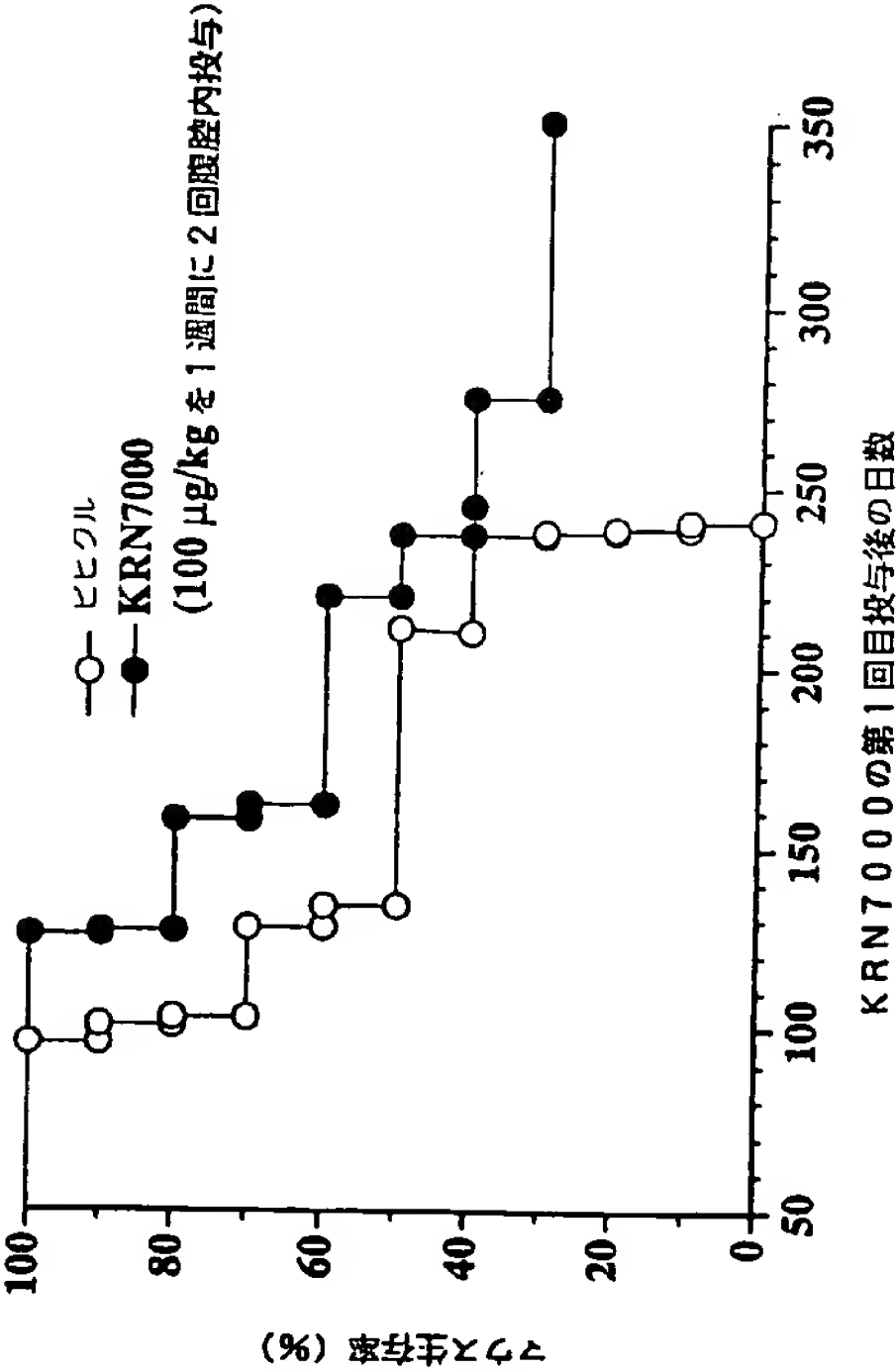


FIG. 4

5/12

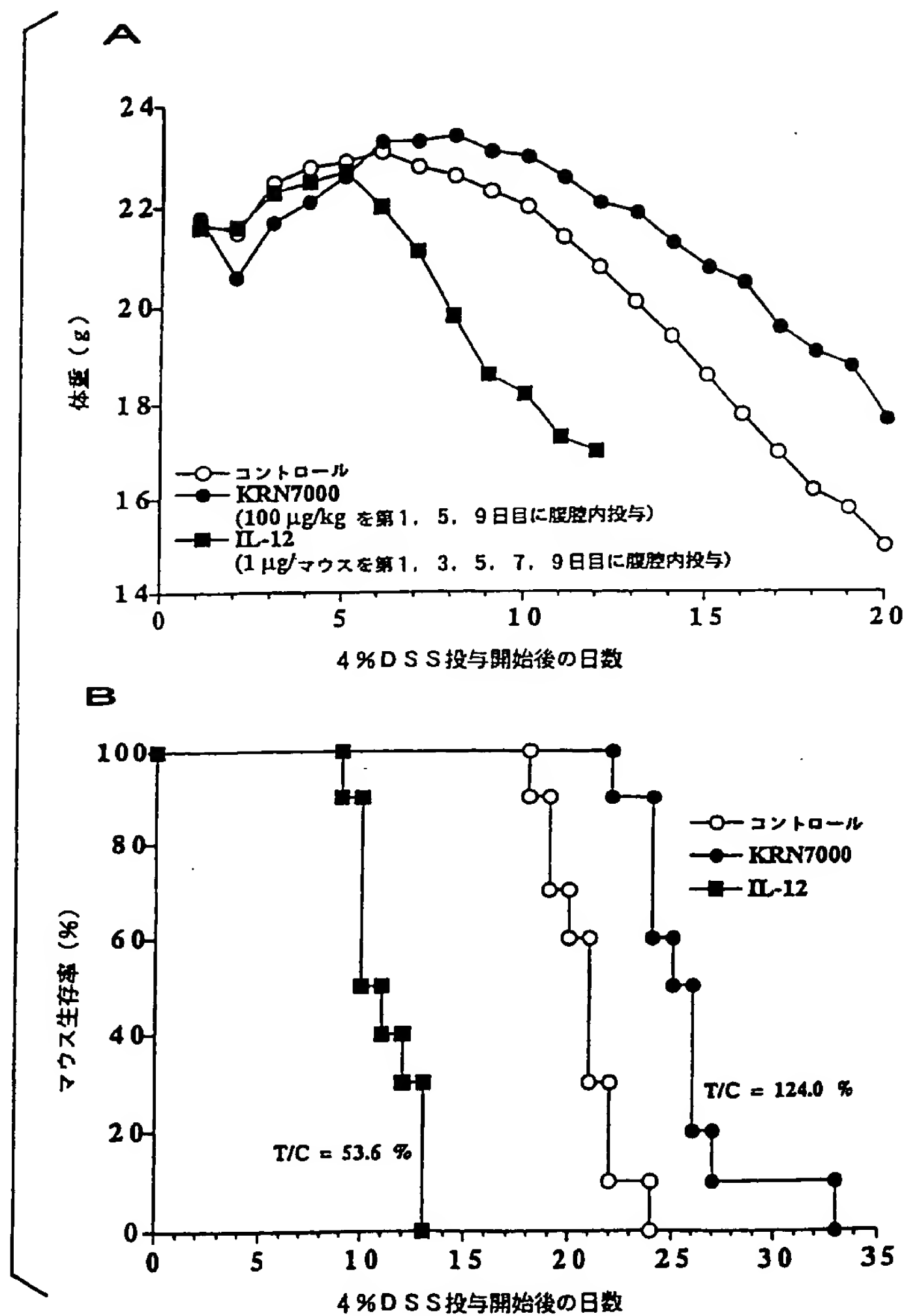


FIG. 5

6/12

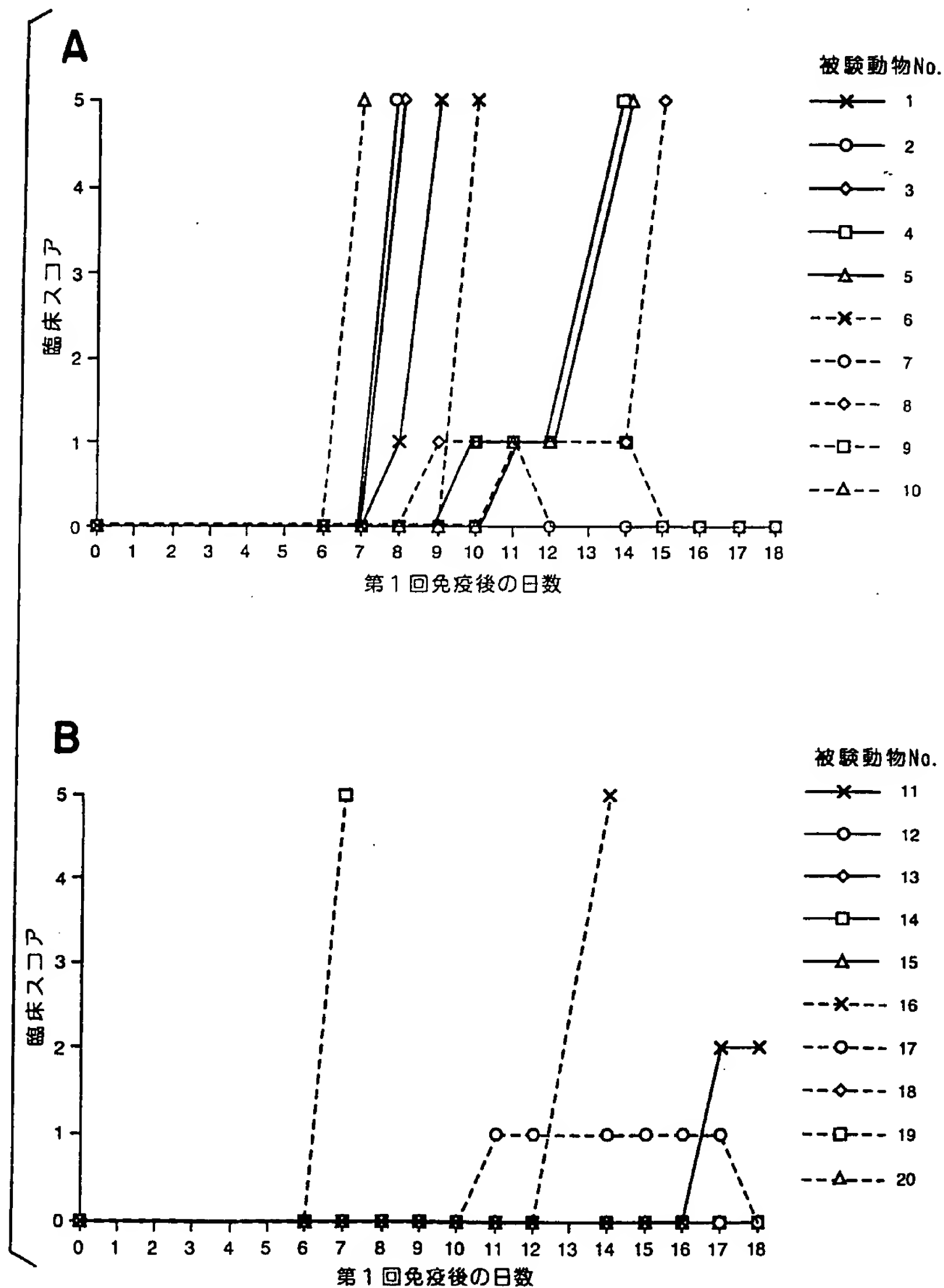


FIG. 6

7/12

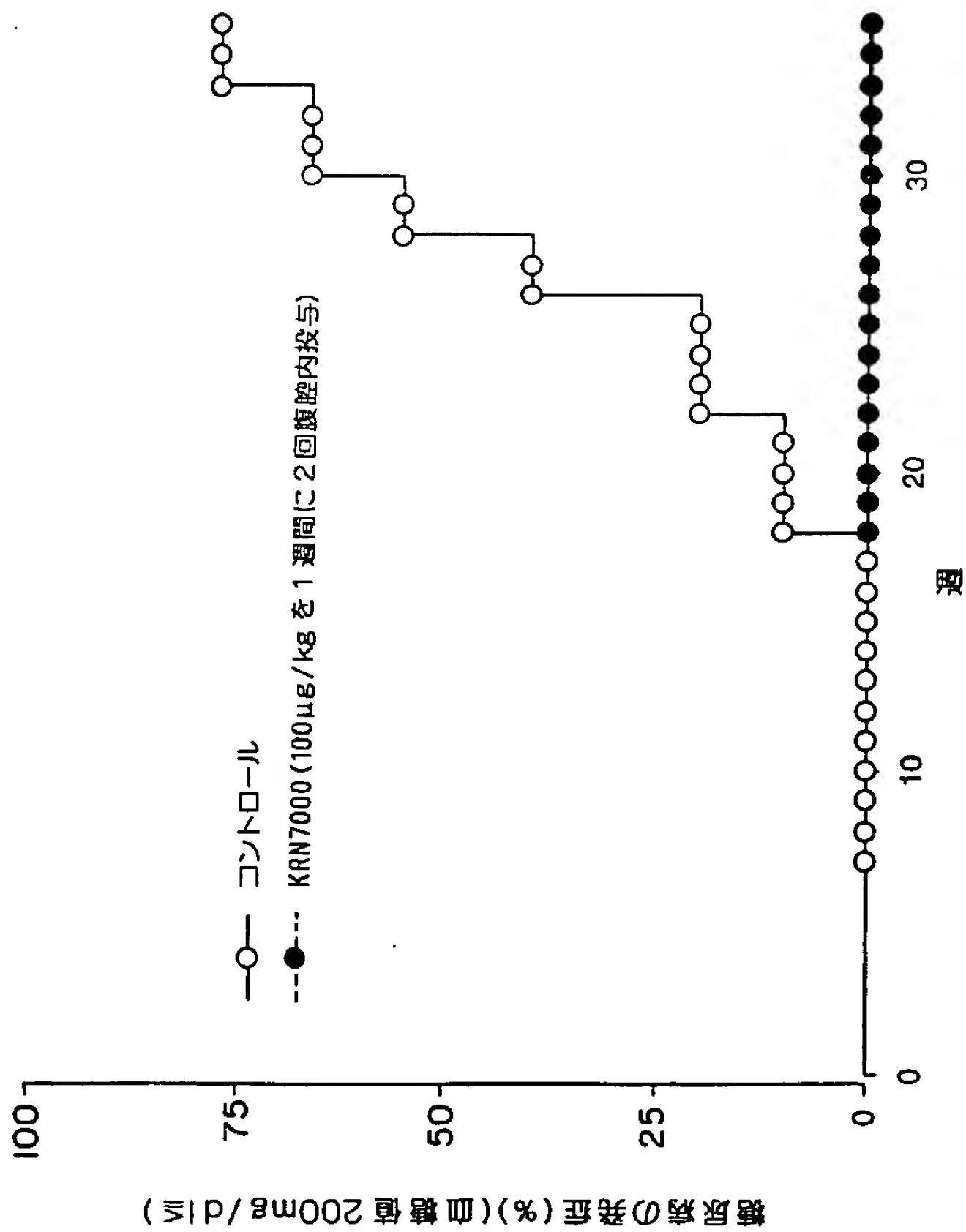
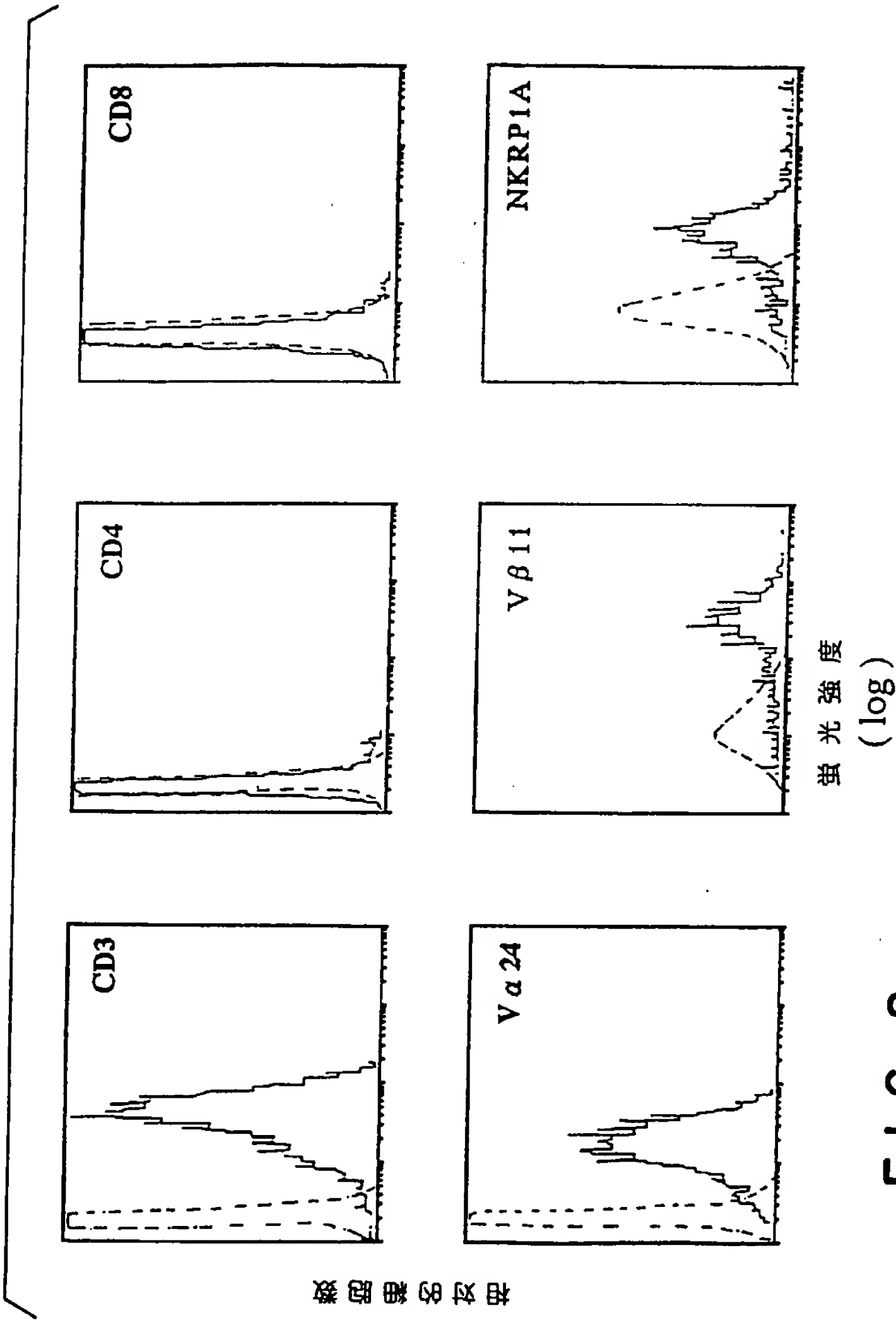


FIG. 7

8/12



9/12

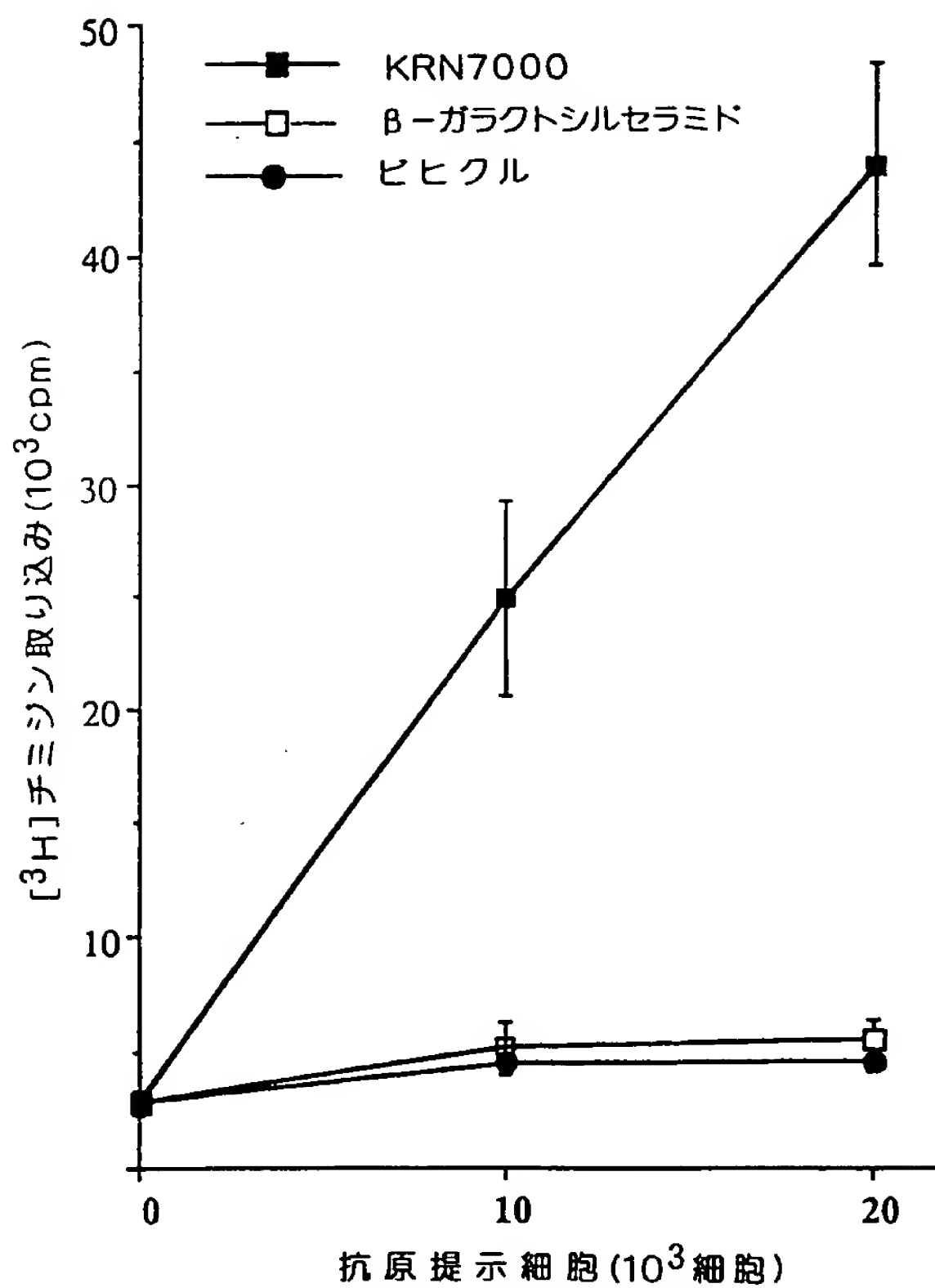


FIG. 9

10/12

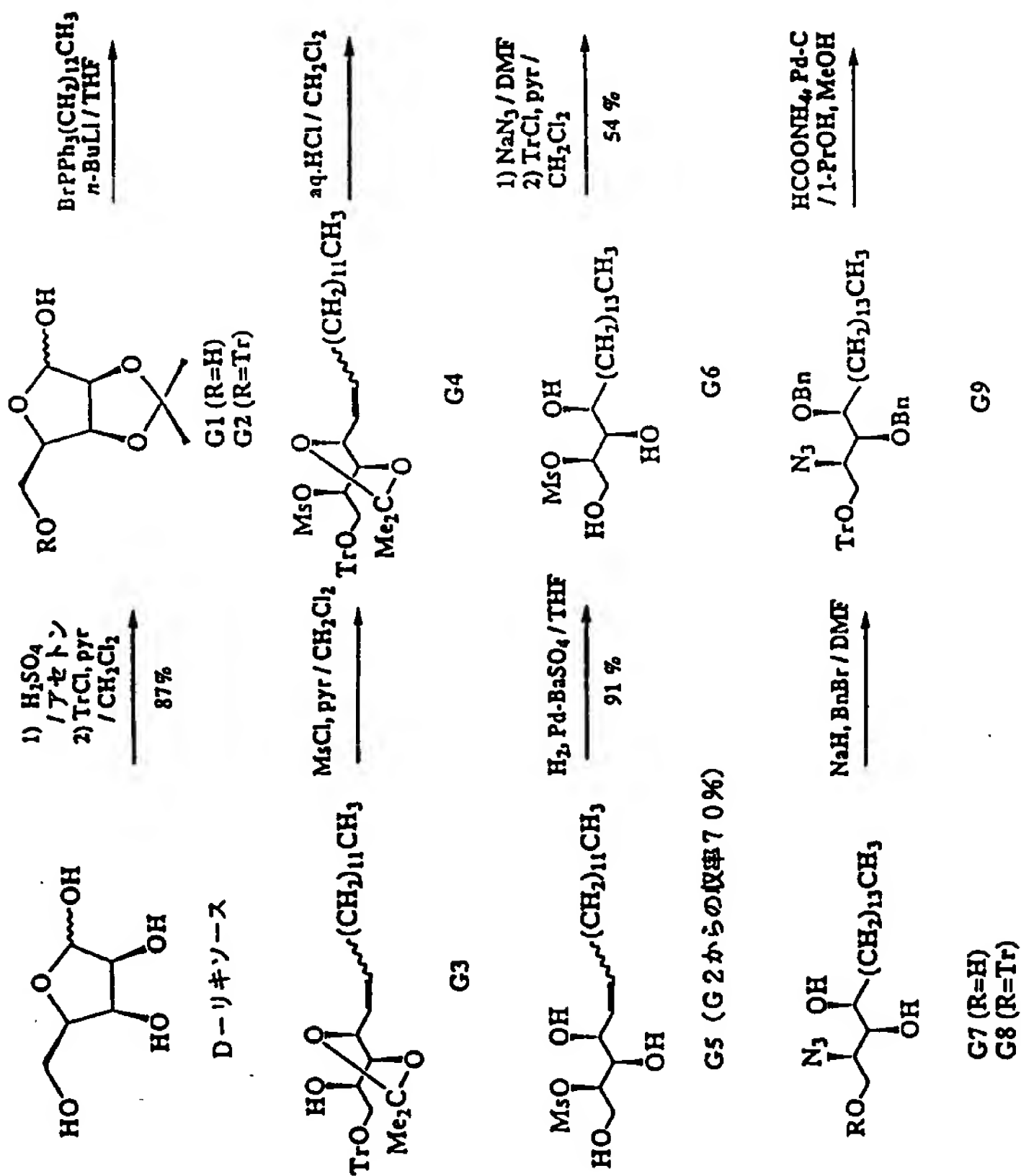
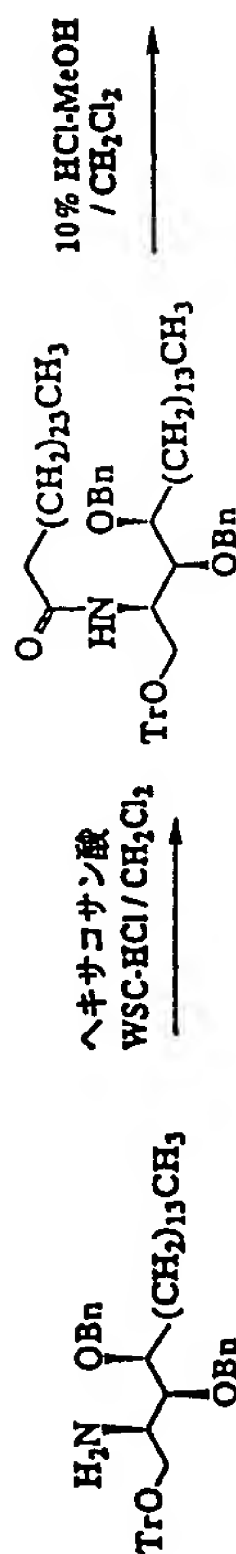


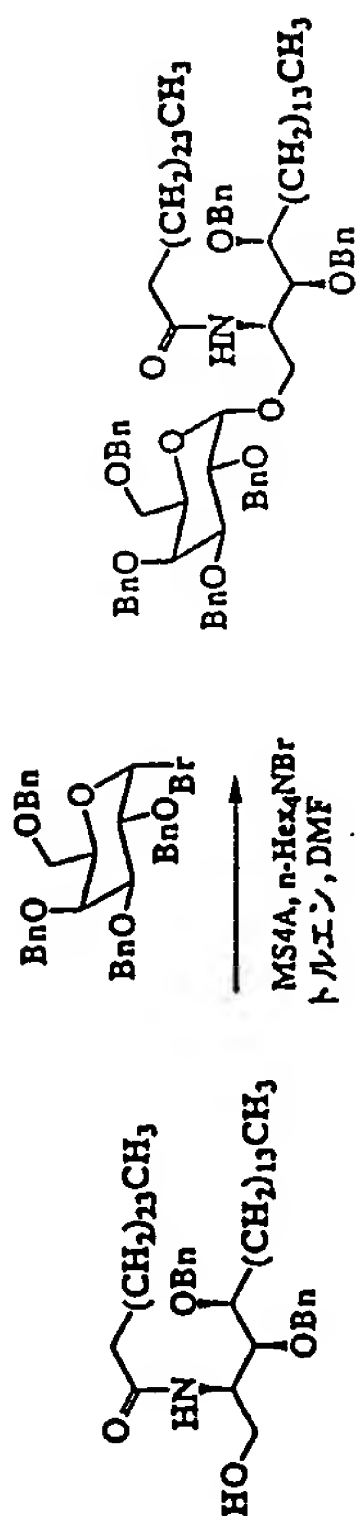
FIG. 10

11/12



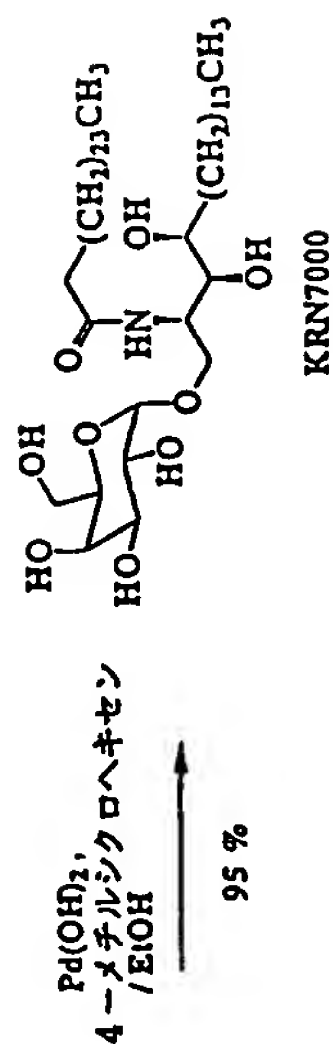
G10

G11



G12 (G9からの収率77%)

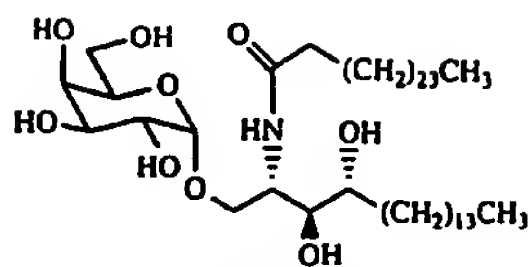
G13



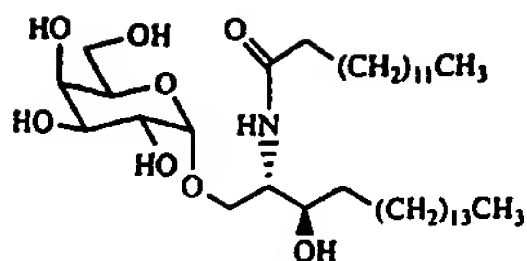
KRN7000

FIG. 11

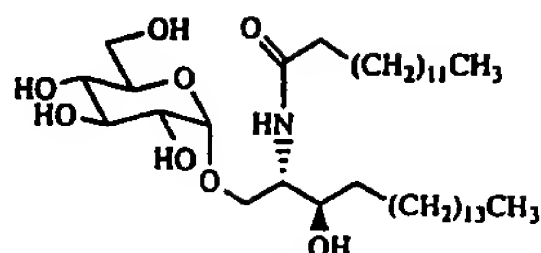
12/12



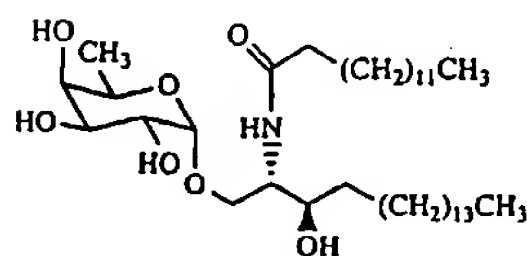
KRN7000



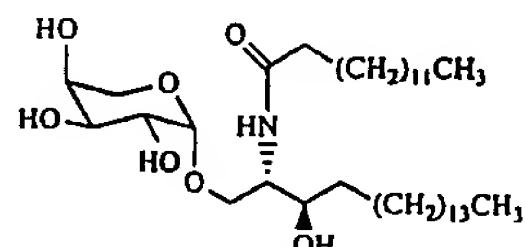
AGL-517



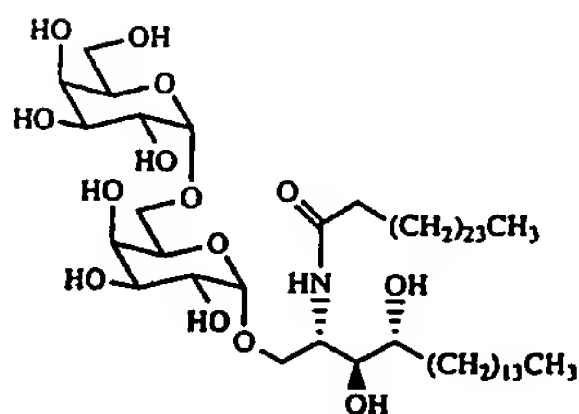
AGL-563



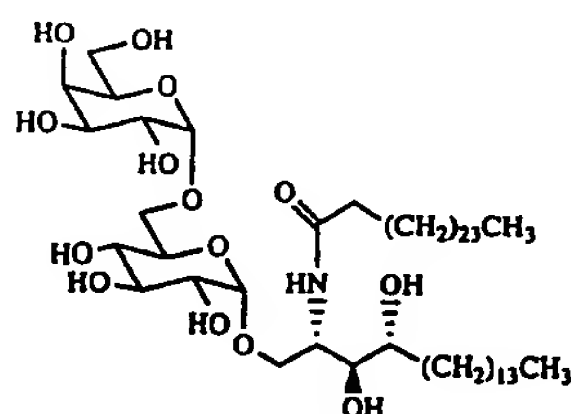
AGL-571



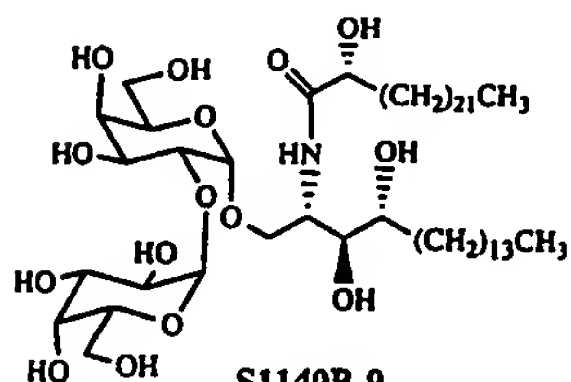
AGL-577



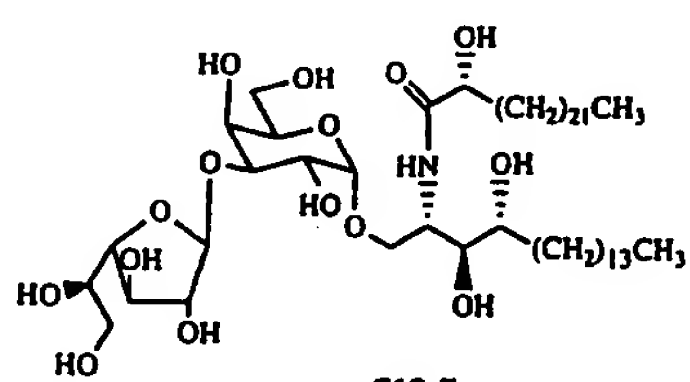
AGL-586



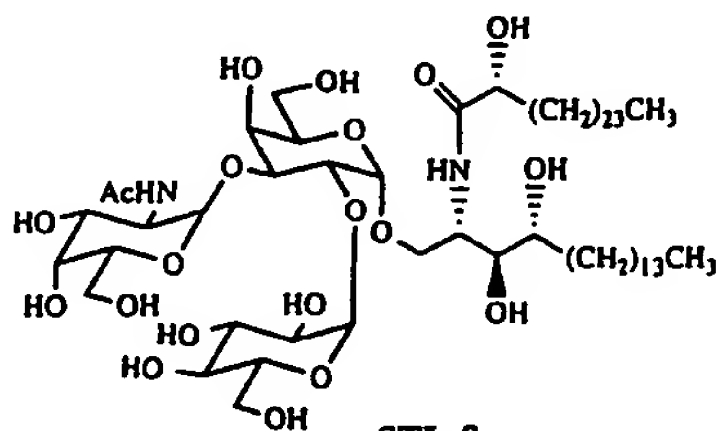
AGL-584



S1140B-9



719-7



STL-8

FIG. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01657

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K31/70, C12N5/06, C12N5/08 // C07H15/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K31/70, C12N5/06, C12N5/08, C07H15/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOBAYASHI E., et al., "Enhancing Effects of Agelasphin-11 on Natural Killer Cell Activities of Normal and Tumor-Bearing Mice", Biol. Pharm. Bull., Vol. 19, No. 3, (1996), p.350-353	1-30
A	MOTOKI K., et al., "Effects of α -Galactosylceramides on Bone Marrow Cells in Vitro and Hematopoiesis in Vivo", Biol. Pharm. Bull., Vol. 19, No. 7, (1996), p.952-955	1-30
A	KOBAYASHI E., et al., "KRN7000, A Novel Immunomodulator, and Its Antitumor Activities", Oncology Research, Vol. 7, No. 10/11, (1995), p.529-534	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 3, 1998 (03. 07. 98)

Date of mailing of the international search report

July 14, 1998 (14. 07. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01657

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAGUCHI Y., et al., "Enhancing Effects of (2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-Galactopyranosyl)-2-(N-Hexacosanoylamino)-1,3,4-Octadecanetriol (KRN7000) on Antigen-Presenting Function of Antigen-presenting Cells and Antimetastatic Activity of KRN7000-Pretreated Antigen-Presenting Cells", Oncology Research, Vol. 8, No. 10/11, (1996), p.399-407	1-30
A	TAKEDA K., et al., "Liver NK1.1 ⁺ CD4 ⁺ $\alpha\beta$ T Cells Activated by IL-12 as a Major Effector in Inhibition of Experimental Tumor Metastasis", Journal of Immunology, Vol. 156, No. 9, (1996), p.3366-3373	23-30
A	KAWAMURA T., et al., "Cytotoxic activity against tumour cells mediated by intermediate TCR cells in the liver and spleen", Immunology, Vol. 89, (1996), p.68-75	23-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01657

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 31-42

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 31 - 42 fall under the category of inventions of methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/01657

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl[°] A61K 31/70, C12N 5/06, C12N 5/08 // C07H 15/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl[°] A61K 31/70, C12N 5/06, C12N 5/08, C07H 15/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN),
 REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KOBAYASHI E., et al., "Enhancing Effects of Agelasphin-11 on Natural Killer Cell Activities of Normal and Tumor-Bearing Mice", Biol. Pharm. Bull., Vol. 19, No. 3, (1996), p. 350-353	1-30
A	MOTOKI K., et al., "Effects of α -Galactosylceramides on Bone Marrow Cells <i>in Vitro</i> and Hematopoiesis <i>in Vivo</i> ", Biol. Pharm. Bull., Vol. 19, No. 7, (1996), p. 952-955	1-30
A	KOBAYASHI E., et al., "KRN7000, A Novel Immunomodulator, and Its Antitumor Activities", Oncology Research, Vol. 7, No. 10/11, (1995), p. 529-534	1-30

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.07.98

国際調査報告の発送日

14.07.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4C

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YAMAGUCHI Y., et al., "Enhancing Effects of (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-Galactopyranosyl)-2-(N-Hexacosanoylamino)-1,3,4-Octadecanetriol (KRN7000) on Antigen-Presenting Function of Antigen-presenting Cells and Antimetastatic Activity of KRN7000-Pretreated Antigen-Presenting Cells", Oncology Research, Vol. 8, No. 10/11, (1996), p. 399-407	1-30
A	TAKEDA K., et al., "Liver NK1.1 ⁺ CD4 ⁺ α β T Cells Activated by IL-12 as a Major Effector in Inhibition of Experimental Tumor Metastasis", Journal of Immunology, Vol. 156, No. 9, (1996), p. 3366-3373	23-30
A	KAWAMURA T., et al., "Cytotoxic activity against tumour cells mediated by intermediate TCR cells in the liver and spleen", Immunology, Vol. 89, (1996), p. 68-75	23-30

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 1 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 31-42 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 31-42 は、人の治療による処置方法の発明に該当する。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)